



REC'D 11 FEB 2005

WIPO

PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 08 DEC. 2004

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA RÈGLE
17.1. a) OU b)

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr





26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

cerfa
N° 11354*03

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2

BR1

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 e W / 210502

REMISE DES PIÈCES DATE 5 DEC 2003 LIEU 75 INPI PARIS 34 SP N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI 05 DEC. 2003 Vos références pour ce dossier (facultatif) BLOcp263/103FR		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE ■ CABINET ORES ■ 36 rue de St Pétersbourg 75008 PARIS ■	
Confirmation d'un dépôt par télécopie		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
2 NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
<i>Demande de brevet initiale</i> <i>ou demande de certificat d'utilité initiale</i>		N°	Date <input type="text"/>
		N°	Date <input type="text"/>
Transformation d'une demande de brevet européen <i>Demande de brevet initiale</i>		<input type="checkbox"/>	Date <input type="text"/>
		N°	Date <input type="text"/>
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) PROCEDE D'EVALUATION QUANTITATIVE D'UN REARRANGEMENT OU D'UNE RECOMBINAISON GENETIQUE CIBLEE D'UN INDIVIDU ET SES APPLICATIONS.			
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation _____ N° _____ Date <input type="text"/> Pays ou organisation _____ N° _____ Date <input type="text"/> Pays ou organisation _____ N° _____ Date <input type="text"/> <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale		COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE	
Prénoms			
Forme juridique		Etablissement public	
N° SIREN		<input type="text"/>	
Code APE-NAF		<input type="text"/>	
Domicile ou siège	Rue	31-33 rue de la Fédération	
	Code postal et ville	[7,5,0,1,5] PARIS	
	Pays	FRANCE	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif)		N° de télécopie (facultatif)	
Adresse électronique (facultatif)			
<input checked="" type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»			

Remplir impérativement la 2^{ème} page



BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE
page 2/2

BR2

REMISE 5 DEC 2003 DATE LIEU 75 INPI PARIS 34 SP N° D'ENREGISTREMENT 0314289 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI	
6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)			
Nom		ORES	
Prénom		Béatrice	
Cabinet ou Société		CABINET ORES	
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel			
Adresse	Rue	36 rue de St Pétersbourg	
	Code postal et ville	17 5 10 10 18 PARIS	
	Pays	FRANCE	
N° de téléphone (facultatif)		01.53.21.11.00.	
N° de télécopie (facultatif)		01.53.21.08.88.	
Adresse électronique (facultatif)		ores@cabinet-ores.com	
7 INVENTEUR (S)		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques	
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)	
8 RAPPORT DE RECHERCHE		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)	
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> Établissement immédiat <input type="checkbox"/> Établissement différé	
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)		Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence): AG	
10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS		<input checked="" type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences	
Le support électronique de données est joint		<input checked="" type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		<input checked="" type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		1	
11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Le Mandataire, Béatrice ORES (n° 92-4046)		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI 	



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Page suite N° 1.../1...

BR/SUITE

RÉSERVÉ À L'INPI	
REMISE EN DÉLIVRANCE	03 DEC 2003
DATE	75 INPI PARIS 34 SP
LIEU	0314289
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI	

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 829 @ W / 010702

Vos références pour ce dossier (facultatif)		BLOcp263/103FR	
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation	
		Date	
		Pays ou organisation	
		Date	
5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale	<input type="checkbox"/> Personne physique
		Nom ou dénomination sociale	
		Prénoms	
		Forme juridique	
N° SIREN		Etablissement public	
Code APE-NAF			
Domicile ou siège	Rue	101 rue de Tolbiac	
	Code postal et ville	17 15 16 15 14 PARIS Cedex 13	
	Pays	FRANCE	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			
5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input type="checkbox"/> Personne morale	<input type="checkbox"/> Personne physique
		Nom ou dénomination sociale	
		Prénoms	
		Forme juridique	
N° SIREN			
Code APE-NAF			
Domicile ou siège	Rue		
	Code postal et ville		
	Pays		
Nationalité			
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			
1 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI	
Le Mandataire, Béatrice ORES (n° 92-4046)			

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI

PROCEDE D'EVALUATION QUANTITATIVE D'UN REARRANGEMENT OU D'UNE RECOMBINAISON GENETIQUE CIBLEE D'UN INDIVIDU ET SES APPLICATIONS.

La présente invention est relative à un procédé d'évaluation quantitative d'un réarrangement ou d'une recombinaison génétique ciblée d'un individu et notamment du répertoire immunitaire d'un individu et ses applications, notamment dans le suivi d'un traitement ou dans le diagnostic et/ou le pronostic de certaines pathologies.

Les lymphocytes T et B jouent un rôle prépondérant dans l'adaptation de la réponse immunitaire. Ils sont capables de reconnaître un grand nombre d'antigènes, à l'aide de deux groupes de récepteurs spécifiques : les récepteurs des cellules T (TCR ou T-cell receptors) et les immunoglobulines (Ig). Les TCRs sont stimulés par les antigènes, sous la forme de peptides liés aux molécules du CMH de classe I ou de classe II et présentés aux dits TCRs par les cellules présentatrices des antigènes (1, 2).

Chaque TCR (spécifique d'un antigène) est exprimé à la surface des cellules T et est constitué de deux hétérodimères liés à la membrane et associé au complexe CD3 ; ces hétérodimères sont composés de deux chaînes polypeptidiques $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$ (3), liées entre elles par un pont disulfure ; chaque chaîne comprend un domaine variable (V) et un domaine constant (C). Les domaines α et β ou γ et δ des régions variables forment la zone de liaison à l'antigène (4, 5). Les domaines de reconnaissance de l'antigène des TCRs sont générés dans les lymphocytes T au cours de leur différenciation, essentiellement suite à des réactions de recombinaison somatiques ADN-site spécifique, dénommées recombinaisons V(D)J (9, 10). Pendant le développement des cellules T, les chaînes α , β , γ et δ des TCRs sont assemblées suite au réarrangement de leurs gènes idioines, indépendamment des différents loci (TCRAD, TCRB, TCRG). Chez l'Homme, les gènes des TCRs sont localisés sur les chromosomes 7 et 14 : les gènes codant pour la chaîne TCRD sont localisés dans le locus de la chaîne TCRA sur le chromosome 14q11-12, alors que les gènes codant pour les chaînes TCRB et TCRG sont localisés sur le chromosome 7, respectivement aux positions 7q32-35 et 7p15. Ces quatre loci codent pour les domaines constants et

variables des quatre chaînes. Les domaines V, dans la chaîne TCRA sont assemblés, à partir de segments de gènes V et J.

Ainsi, l'ensemble des lymphocytes T définissent un répertoire immunitaire, qui constitue le registre des différentes formes des récepteurs et de leur
5 spécificité antigénique. Le répertoire se base sur la grande diversité des structures des récepteurs des antigènes. Pour générer cette diversité, les lymphocytes sont dotés de plusieurs mécanismes dont le principal est la recombinaison V(D)J. Brièvement, les gènes codant pour les récepteurs des antigènes sont discontinus au niveau du génome des cellules de l'organisme de telle sorte que ces gènes sont inactifs. On distingue
10 plusieurs segments de gènes :

- a) la région constante (C), qui est commune à tous les récepteurs d'une famille, quelle que soit leur spécificité,
- b) la région variable (V), dont le nombre varie suivant la chaîne TCR considérée, de quelques gènes à plusieurs centaines,
- 15 c) la région de jonction (J), qui est un gène intermédiaire entre V et C, dont le nombre varie de 1 à plusieurs dizaines, suivant la chaîne TCR considérée et enfin,
- d) la région de diversité (D), qui est un petit gène de quelques nucléotides présents seulement dans les chaînes β et δ des TCR et qui s'intercale entre
20 V et J.

Le processus de réarrangement met en œuvre un complexe enzymatique (la recombinaise V(D)J) (14), qui cible spécifiquement les séquences signal de recombinaison (RSS ou *recombination signal sequence*) flanquant les séquences codant les segments de gènes dispersés V et J.

25 De manière plus précise, les composants principaux de la recombinaise sont les produits de deux gènes d'activation de la recombinaison RAG-1 et RAG-2 (15, 16). Les protéines RAG-1 et RAG-2 se lient à des motifs nucléotidiques conservés, dénommés séquences signal de recombinaison (RSS), qui flanquent chaque gène V, D et J (17, 18).

30 La RSS consensus consiste en une séquence heptamérique, directement adjacente à l'élément codant et en une séquence nonamérique séparée par un bras espaceur comprenant 12 ou 23 nucléotides relativement non conservés. Les sites

de jonction sont déterminés par les RSS et la préférence avérée pour la recombinaison entre une RSS avec un bras espaceur de 12 nucléotides avec une RSS avec un bras espaceur de 23 nucléotides assure une recombinaison V(D)J entre deux segments de type différents (V α et J α , par exemple) (19, 20).

5 De manière plus générale, la recombinaison V(D)J comprend un ensemble de réactions enzymatiques incluant des coupures spécifiques, des activités d'exonucléase et de polymérase et des ligatures d'ADN, qui conduit à la formation d'une entité génique fonctionnelle par lymphocyte. Ce gène fonctionnel est constitué de la région C et d'une combinaison d'un V et d'un J (optionnellement de D), qui
10 constitue la marque d'identité moléculaire du lymphocyte et la base moléculaire de la spécificité du récepteur antigénique.

Les lymphocytes disposent ainsi d'un mécanisme sophistiqué pour générer un répertoire TCR diversifié.

En plus du processus de recombinaison (diversité combinatoire), on
15 observe également des délétions ou des insertions au niveau des jonctions V-J ou V-DJ (9, 21). Ces différents mécanismes permettent d'augmenter la diversité du répertoire TCR et donc le nombre d'antigènes reconnus. Ce dernier mécanisme n'est pas codé, mais augmente considérablement le répertoire TCR.

Un autre facteur de diversification est le couplage des chaînes α et β
20 (ou γ et δ) (22) pour former l'hétérodimère TCR.

Ainsi, la diversité potentielle des TCRs- $\alpha\beta$ générée par recombinaison aléatoire V(D)J a été estimée à environ 10^{15} (2, 23) si n'importe quel gène V se réarrange avec n'importe quel gène D et/ou J (2, 23).

Cependant, des données récentes obtenues à partir de thymus de
25 souris ont montré que le nombre de recombinaisons V-J α est considérablement inférieur à celui prédit par le modèle de réarrangement aléatoire et qu'il existe des associations préférentielles entre les segments V α et J α en fonction de leur localisation sur le locus aboutissant à une utilisation régulée et coordonnée (24).

Le locus humain TCRAD comprend environ 1 000 kb et consiste en
30 54 gènes V α appartenant à 41 familles et 8 pseudogènes, 61 gènes J α incluant 3 pseudogènes J et un gène unique C α (25, 26).

En dépit d'un taux élevé d'identité de séquence entre les loci TCR humain et de souris, l'organisation des gènes V et J n'est que partiellement conservée entre les deux espèces.

5 Alors que le nombre de segments de gènes J pour les chaînes α et β est bien conservé dans les deux espèces, il existe des différences significatives dans le nombre de segments V α et V β .

En particulier, il y a au moins deux fois plus de gènes V α chez la souris que chez l'homme et 1/3 de plus de gènes V β chez l'homme par rapport à la

10 souris. Pendant l'évolution, le locus TCRAD de souris a été soumis à des processus multiples de duplication impliquant de larges portions du locus, tandis que chez l'homme la duplication ne s'est produite que dans des parties limitées du locus TCRAD (26).

Ces différents processus montrent que les données observées chez la
15 souris ne sont pas directement transposables chez l'homme.

L'analyse du répertoire immunitaire chez l'homme a été proposée, à des fins diagnostiques.

Par exemple, Hodges E et al. (46) résument le rôle diagnostic des tests d'évaluation des gènes des récepteurs des cellules T (TCR). En particulier, les
20 Auteurs de cet article montrent qu'il est maintenant possible d'étudier la pathogénèse d'une maladie au niveau génomique. Le réarrangement génique des récepteurs des cellules T (TCR) est un événement important dans l'ontogénie des cellules T, qui permet aux cellules T de reconnaître les antigènes de manière spécifique.

La moindre dérégulation dans ce processus hautement complexe
25 peut entraîner une maladie.

Cet article fait le point sur les connaissances concernant le mécanisme de réarrangement génique des TCR et décrit les désordres dans lesquels on observe des expansions et des proliférations clonales des cellules T.

Les méthodes actuellement utilisées pour étudier les différentes
30 populations de cellules T, leur rôle diagnostic et les limitations de ces méthodes sont également exposés dans cet article.

Le Tableau I de ce document résume les différents gènes codant pour les chaînes du TCR : α (A), β (B), γ (G) et δ (D) et montre en particulier la complexité du locus TCRAD. Chez les individus normaux, le répertoire TCR est stable et polyclonal, alors que des populations clonales sont le signe d'une réponse immunitaire spécifique contre une pathologie tumorale ou infectieuse. Ainsi, des populations clonales et oligoclonales sont observées dans des conditions non tumorales, telles que des infections HIV, EBV, des états particuliers, tels que le sujet âgé, l'autoimmunité, l'immunodéficience variable commune (CVID) et l'immunodéficience combinée sévère (SCID), dans laquelle des anomalies des mécanismes intervenant dans la recombinaison des V(D)J ne permettent qu'un nombre limité de réarrangements corrects du gène du TCR. Les Auteurs de cet article considèrent que :

- Pour l'étude du phénotype, la cytométrie de flux, constitue une méthode rapide, relativement peu chère d'analyse du répertoire TCR ; en outre une telle méthode est reproductible et permet une évaluation quantitative de l'expression de différents gènes V dans les différents sous-ensembles de cellules T (cellules CD4+ et cellules CD8+).

- Pour l'étude du génotype, la PCR, qui a largement remplacé l'analyse en Southern blot est utile, pour les études de clonalité, dans la mesure où la PCR offre un certain nombre d'avantages et notamment la rapidité de réalisation et la possible utilisation d'une faible quantité d'ADN.

Plusieurs protocoles de PCR différents peuvent avantageusement être utilisés :

1. L'amplification de tous les segments V, en utilisant des amorces spécifiques de familles complémentaires à tous les gènes TCRV et une amorce située dans la région constante (méthode semi-quantitative uniquement).

2. une PCR qui inclut une étape de modification de tous les transcrits TCR, de telle sorte qu'ils puissent être amplifiés par un seul oligonucléotide (PCR d'ancrage).

3. une PCR permettant la production de transcrits circulaires par ligation.

Les deux dernières méthodes exigent, pour être mises en œuvre, une expertise technique de haut niveau (problème d'utilisation en routine), mais permettent une analyse quantitative de la population de cellules T et ont déjà été appliquées aux études de clonalité et à l'évaluation du répertoire TCR dans différentes pathologies.

Il ressort de cet article que les méthodes d'évaluation de la clonalité, en routine doivent de préférence répondre aux caractéristiques suivantes :

- simplicité ;
- robustesse avec de bons rendements de détection et une bonne sensibilité ;
- mise en œuvre du test sur ADN ;
- augmentation de la détection et de la sensibilité par utilisation d'amorces sélectionnées.

Il ressort également de cet article :

- que l'analyse PCR des gènes TCRG répond à ces conditions (études de clonalité en pathologie clinique), en raison du répertoire limité des gènes TCRG, qui diminue ainsi le nombre d'amorces PCR requises. Toutefois, ce choix a l'inconvénient d'entraîner des amplifications parasites (réarrangements similaires dans les cellules normales) ;
- que l'analyse PCR des gènes TCRD est un outil utile dans l'analyse de certaines tumeurs et notamment des MRD ;
- que le locus TCRB est le locus de choix pour l'établissement de la clonalité des tumeurs exprimant TCR $\alpha\beta$, alors que
- le locus TCRA est trop complexe pour des analyses clonales de l'ADN.

C'est la raison pour laquelle les différentes méthodes d'analyse des répertoires TCR, actuellement proposées, ne préconisent jamais l'analyse du répertoire TCRA :

- Analyse par transfert de Southern (ADN)

Cette technique est lourde à mettre en œuvre, peu exhaustive et peu quantitative. Elle permet d'évaluer les réarrangements V(D)J, mais elle est peu sensible car elle nécessite plusieurs µg d'ADN, et d'autre part, elle est peu résolutive pour l'identification des gènes V et J. Enfin, elle se prête mal à une automatisation.

- Analyse par Immunoscope® (Brevet US 5,635,354 ; Pannetier et al., *Immunol. Today*, 1995, 16, 4, 176-181) ; cette méthode est uniquement qualitative.

- Analyse de la diversité des régions de recombinaison dite CDR3 par Immunoscope® (ARNm) (Demande Internationale PCT WO 02/084567).

Actuellement, cette technique est la plus populaire pour l'évaluation de la diversité des récepteurs antigéniques. Elle se base sur l'utilisation des ARNs qui, une fois convertis en ADNc par la reverse transcriptase, sont sujets à des réactions d'amplification par PCR. Les fragments de gènes amplifiés sont courts (quelques dizaines de nucléotides), ils s'étendent entre le gène V et le gène C ou J et incluent la CDR3 qui est la région la plus polymorphe des récepteurs des antigènes. Elle permet d'estimer la diversité générée lors des réarrangements. Elle donne une indication sur la diversité relative d'un répertoire, sans pouvoir quantifier l'ensemble du répertoire. Ses points faibles résident dans :

1) l'utilisation d'ARN qui est un matériel génétique facilement dégradé et nécessitant des conditions opératoires particulières,

2) le fait qu'il peut exister des biais dans l'évaluation des réarrangements dus au fait que tous les gènes V ne sont pas nécessairement transcrits avec la même efficacité,

3) la synthèse d'ADNc peut varier en fonction des transcrits ; cette étape peut donc introduire un biais difficilement contrôlable.

Cette technique nécessite un nombre assez important de réactions d'amplification rendant difficile l'analyse complète de la diversité d'un récepteur. Ainsi, pour la chaîne bêta du TCR humain, il faudrait 25 réactions indépendantes pour les V, puis reprendre chacune d'entre elles avec l'un des 12 J, pour une analyse en électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant.

- Cytométrie de flux (voir Hodges E. et al. précité, 46)

Cette technique utilise des anticorps marqués à la fluorescéine, spécifiques des régions V des récepteurs. Elle présente l'intérêt de mesurer l'expression du récepteur antigénique à la surface du lymphocyte. Cependant, elle est
5 très limitée :

. par le manque d'anticorps qui ne permet pas une analyse complète du répertoire ;

. par sa faible sensibilité qui nécessite des échantillons cellulaires de taille importante (plusieurs dizaines de millions de lymphocytes) ;

10 . sa faible résolution puisqu'elle ne permet que d'identifier le V sans donner d'information sur les combinaisons avec les J ;

. la nécessité de travailler avec des cellules.

En conséquence, la présente invention s'est donnée pour but de pourvoir à un procédé d'évaluation de réarrangements ou de recombinaisons de gènes
15 et notamment du répertoire TCR, qui réponde mieux aux besoins de la pratique que les procédés de l'art antérieur précités.

Pour obtenir une méthode quantitative, simple à mettre en œuvre, robuste, fiable et quantitative, la présente invention préconise d'utiliser dans des conditions définies, un nombre restreint de réactions enzymatiques de polymérisation
20 en chaîne de l'ADN, dites de « longue PCR » (LPCR) permettant de détecter plusieurs réarrangements de gènes et notamment plusieurs réarrangements V(D)J des gènes codant les TCRAD directement au niveau de l'ADN génomique avec une seule réaction enzymatique (PCR multiplex).

L'invention utilise ainsi l'amplification d'ADN pour détecter en une
25 seule étape les réarrangements des gènes V(D)J codant pour les récepteurs spécifiques des antigènes. L'invention peut être appliquée à d'autres événements de réarrangements de gènes ou de recombinaisons génétiques ayant des sites définis.

En conséquence, l'invention concerne également un procédé d'évaluation de toute recombinaison génétique ciblée.

30 La présente invention a donc pour objet un procédé d'évaluation quantitative d'un réarrangement ou d'une recombinaison génétique ciblée chez un individu, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend au moins :

(a) l'extraction de l'ADN génomique humain, à partir d'un échantillon biologique,

(b) l'amplification d'un segment dudit ADN génomique, de taille comprise entre quelques centaines de paires de bases et plusieurs dizaines de kb, par
5 PCR multiplex, en présence :

* d'un ou plusieurs couples d'amorces, sélectionnées de manière à répondre aux caractéristiques suivantes :

- au moins l'une desdites amorces de l'un desdits couples d'amorces, s'hybride en amont et/ou à l'extrémité 5' d'un gène Vx à amplifier, susceptible
10 d'intervenir dans ledit réarrangement génétique ;

- au moins l'autre desdites amorces de l'un desdits couples d'amorces s'hybride en aval et/ou à l'extrémité 3' d'un gène Jy à amplifier, susceptible d'intervenir dans ledit réarrangement génétique ;

* et d'une ADN polymérase ou d'un mélange d'ADN polymérases
15 permettant l'amplification de segments d'ADN génomique de taille comprise entre quelques centaines de paires de bases et plusieurs dizaines de kb, de préférence de taille supérieure à 10 kb et ayant une activité de correction permettant d'améliorer sensiblement l'élongation ;

ladite amplification comprenant outre l'étape de dénaturation
20 initiale, des cycles de dénaturation, d'hybridation et d'élongation et, dans lesquels les étapes d'élongation sont effectuées au moins pendant 10 minutes à 68°C-72°C ;

(c) la séparation des fragments d'ADNg amplifiés et

(d) la détection des segments réarrangés ou recombinés.

Dans le cas où le réarrangement ou la recombinaison génétique
25 ciblée concerne les récepteurs TCRAD, ledit procédé comprend :

(a) l'extraction de l'ADN génomique humain, à partir d'un échantillon biologique,

(b) l'amplification d'un segment dudit ADN génomique, de taille comprise entre quelques centaines de paires de bases et plusieurs dizaines de kb, par
30 PCR longue multiplex, en présence :

* d'un ou plusieurs couples d'amorces, sélectionnées de manière à répondre aux caractéristiques suivantes :

- au moins l'une desdites amorces de l'un desdits couples d'amorces, dénommée amorce V, s'hybride de manière spécifique avec une région située en amont de la séquence RSS d'un gène Vx à amplifier, correspondant à un segment V du domaine variable de la chaîne α d'un récepteur des cellules T (TCRAD) ;

5 - au moins l'une desdites amorces de l'un desdits couples d'amorces, dénommée amorce J s'hybride de manière spécifique avec une région située en aval de la séquence RSS d'un gène Jy à amplifier, avec l'extrémité 3' dudit gène Jy à amplifier ou dans ledit gène Jy à amplifier, correspondant à un segment J de la chaîne α d'un récepteur des cellules T ;

10 * et d'une ADN polymérase ou d'un mélange d'ADN polymérases permettant l'amplification de segments d'ADN génomique de taille comprise entre quelques centaines de paires de bases et plusieurs dizaines de kb, de préférence de taille supérieure à 10 kb et ayant une activité de correction permettant d'améliorer sensiblement l'élongation ;

15 ladite amplification comprenant outre l'étape de dénaturation initiale, des cycles de dénaturation, d'hybridation et d'élongation et, dans lesquels les étapes d'élongation sont effectuées au moins pendant 10 minutes à 68°C-72°C ;

(c) la séparation des fragments d'ADNg amplifiés et

(d) la détection des segments V(D)J recombinés.

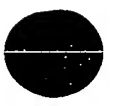
20 Ce procédé présente un certain nombre d'avantages :

- il permet une analyse des combinaisons V(D)J au niveau du génome, ce que ne permet pas la technique de l'Immunoscope®.

- il permet une analyse moléculaire au niveau de l'ADN génomique.

25 En mesurant la quantité d'une combinaison donnée de gènes V(D)J, on peut avoir une évaluation du nombre de lymphocytes possédant ce réarrangement, puisqu'il y a proportionnalité entre le nombre de gènes réarrangés et le nombre de lymphocytes : un lymphocyte ne peut avoir que deux réarrangements pour un type de récepteur, soit un réarrangement par chromosome. Ce type d'information n'est pas accessible par l'analyse de la diversité des régions de recombinaison dite CDR3.

30 - il autorise une évaluation exhaustive de la diversité de récepteurs antigéniques, ce que ne permet ni la cytométrie de flux, ni la technique de Southern.



- il permet de diminuer sensiblement le nombre de réactions de PCR pour une analyse complète du répertoire. Ceci est possible grâce à l'analyse simultanée de plusieurs gènes V et J dans une même réaction d'amplification et une même piste d'électrophorèse. Par exemple, pour la chaîne TCR alpha chez l'homme, il faut
5 3355 réactions correspondant aux différentes combinaisons VJ pour détecter et quantifier les réarrangements ; le procédé selon l'invention permet de réaliser l'analyse avec 10 fois moins de réactions. En particulier, la combinaison des étapes du procédé selon l'invention et plus particulièrement la combinaison de l'étape (c) de séparation avec l'étape (b) d'amplification, coopère pour améliorer, de manière significative, les
10 performances du procédé selon l'invention, notamment en sélectionnant le système de séparation le plus adapté.

- il permet de quantifier les réarrangements par mesure de l'intensité relative des bandes d'électrophorèse issues d'une même réaction et qui sont analysées dans une même piste d'électrophorèse. Grâce à une standardisation tenant compte des
15 différences de taille, il est possible en particulier de normaliser les valeurs et d'obtenir la quantification de la proportion de chaque réarrangement par rapport à l'ensemble. Aucune technique ne permet actuellement d'obtenir ces résultats.

- il permet l'identification des gènes V et J du récepteur, l'identité du gène V est donnée par l'amorce utilisée lors de l'amplification, l'identité du gène J est
20 obtenue par mesure de la taille du fragment amplifié avec l'amorce J utilisée et par référence avec la séquence nucléotidique publiée. Cette opération est facilitée par l'utilisation de logiciels d'alignement de séquences et de comparaison de motifs tels que Blast, (www.ensembl.org), IMGT/GeneInfo (<http://imgt.cines.fr/GeneInfo>) etc.. Cette information peut être obtenue par l'analyse par l'Immunoscope[®], mais
25 l'identification du segment J se fait au cas par cas, alors qu'avec le procédé selon l'invention, plusieurs segments J peuvent être identifiés lors d'une même réaction.

- il permet de révéler des combinaisons V(D)J particulièrement abondantes dans un mélange. Ceci peut se révéler utile pour détecter une réponse spécifique immuno-dominante, c'est-à-dire due à un (réponse monoclonale) voire à
30 quelques clones (réponse oligoclonale) de lymphocytes. En outre, ceci peut servir à la détection de proliférations de lymphocytes telles que celles observées dans les cancers de lymphocytes (lymphomes, myélomes, leucémies). Les leucémies provenant de

lymphomes B peuvent être détectées par une analyse directe des Ig circulant au niveau du sérum de sang. Mais la détection des leucémies ne produisant pas d'Ig dans le sérum et celle des leucémies des lymphomes T restent difficiles et peu quantitatives. Le procédé selon l'invention permet d'identifier les combinaisons V(D)J anormalement abondantes et ainsi permet la détection de proliférations dues à des leucémies. Par l'analyse au niveau du génome, le procédé selon l'invention autorise une détection plus facile et sensible du nombre de cellules cancéreuses, dérivées de lymphocytes B et/ou T, et par conséquent, permet d'apporter un diagnostic plus précoce et plus exhaustif par rapport aux techniques déjà existantes telles que la technique de Southern ou l'Immunoscope® de la chaîne TCR beta.

L'étape (a) d'extraction est réalisée par des techniques connues qui respectent les précautions définies pour la purification de l'ADNg utilisées pour la technique de transfert de type Southern (voir Sambrook J., Fritsch EF., Maniatis T., 1989, *Molecular cloning. A laboratory manual. Second Edition*. Cold Spring Harbor, New York, EUA). Elle peut être avantageusement suivie d'une étape de purification de l'ADNg par les techniques classiques de biologie moléculaire

Selon un mode de mise en œuvre avantageux de l'étape (b) d'amplification, la sélection des amorces est effectuée :

- par analyse systématique de l'ensemble du locus concerné et notamment du locus TCRAD humain à l'aide d'un logiciel convenable d'alignement de séquences et de comparaison de motifs, tels que définis ci-dessus et notamment à l'aide d'un logiciel de recherche de séquence homologue (NTI Vector suite 8.0 » de la société Informax Inc., par exemple),

- sélection des amorces dont l'extrémité 3'OH est complémentaire uniquement de la région d'intérêt, telle que définie ci-dessus,

- élimination des amorces formant des auto-dimères ou des épingles à cheveux stables, notamment par une analyse à l'aide d'un logiciel convenable d'alignement de séquences et de comparaison de motifs, et notamment à l'aide d'un logiciel de recherche de séquence homologue (logiciel « vector NTI suite 8.0 » de la société Informax Inc., par exemple), et

- élimination des couples d'amorces formant des hybrides entre eux.

Ainsi, l'ensemble de ces différentes étapes de sélection diminuent les biais de la PCR comme la compétition entre les amorces ou avec d'autres séquences cibles que celles sélectionnées et par conséquent améliore le rendement et la spécificité de la PCR nécessaire pour la réalisation des analyses des réarrangements en PCR longue multiplex.

Conformément à l'invention les amorces et notamment les amorces V et J des couples d'amorces V/J sont sélectionnées dans le groupe constitué par les amorces illustrées au Tableau I ci-après :

Espèce	HUMAIN			
Locus	TCRAD			
TRAV		S/A	bp	tm
hTRAV1	GGTCGTTTTTCTTCATTCCTTAGTCG (SEQ ID NO:1)	S	27	58
hTRAV2	TCTCTTCATCGCTGCTCATCCTCC (SEQ ID NO:2)	S	24	61
hTRAV3	TCCCCTTCCCATTTCCTCACTCG (SEQ ID NO:3)	S	22	60
hTRAV5	GCACTTACACAGACAGCTCCTCCACC (SEQ ID NO:4)	S	26	61
hTRAV8	CAGGAGGAACCCAGAGCCAGTC (SEQ ID NO:5)	S	22	59
hTRAV26-2	TGGAGTAGGGCAGGGAGGACAGT (SEQ ID NO:6)	S	23	60
hTRAV35	Ggtgggaagtttggtgatatagtgtc (SEQ ID NO:7)	S	27	59
hTRAV38.2	AGCAGCCAAATCCTTCAGTCTCAA (SEQ ID NO:8)	S	24	58
hTRAV40	Aagacaaaaactccccattgtgaaata (SEQ ID NO:9)	S	26	60
hTRAV41	CCCCTCCTGAAATGTGTAAAGAAATGT (SEQ ID NO:10)	S	28	60
TRAJ do				
hAJ53do	CTTCCCCCTCTCCCTTCAAACCTTAC (SEQ ID NO:11)	A	25	60
hAJ48do	AGCACTTGACGGCAGCAGCA (SEQ ID NO:12)	A	20	60
hAJ41do	TGCCCCGAGACCTGATAACCAA (SEQ ID NO:13)	A	22	61
hAJ29do	TCAGAACAAAGCTGGAGGCAACTAGG (SEQ ID NO:14)	A	25	61
hAJ18do	GGAATAGAAAGCGACTCACTCACCAGG (SEQ ID NO:15)	A	27	60
hAJ10do	CCACTTTTAGCTGAGTGCCTGTCCC (SEQ ID NO:16)	A	25	60
hAJ5do	CTGTCTCTGCAATGATGAAATGGCC (SEQ ID NO:17)	A	25	59
hAJ1do	GGAACTCTGGGCATGGGCAG (SEQ ID NO:18)	A	21	59
hAJ56do	ACTGGGCAGGAGATTTCGGTTAT (SEQ ID NO:19)			
hAJ33do	CGCCCCAGATTAACTGATAGTTGCT (SEQ ID NO:20)			
hAJ24do	ATACTAAGGGCAGGTGAGGCTCCA (SEQ ID NO:21)			

Ainsi, les amorces sélectionnées à l'étape (b) permettent d'obtenir des résultats de qualité : la spécificité des produits de PCR est plus particulièrement établie pour 10 amorces V (SEQ ID NO:1-10), par séquençage des produits d'amplification qui montre la présence d'une séquence unique correspondant au gène V ciblé (voir Tableau III) et la robustesse du choix des amorces.

La spécificité des amorces peut être suivie en utilisant des sondes oligonucléotidiques, telles que celles définies dans le Tableau II ci-après, marquées

qui reconnaissent des séquences internes au produit amplifié ; par hybridation il est ainsi possible de vérifier si la taille observée du fragment amplifié correspond à la taille attendue déduite de la séquence du locus TCR alpha humain, en considérant la distance séparant les amorces V et J et leur réarrangement. Ces sondes sont également
5 avantageusement utilisées à l'étape (d) du procédé selon l'invention.

Tableau II

		S/A	bp	tm
	Sondes			
TRAV				
hTRAV1p	TCGTTTTCCTTCATTCCTTAGTGG (SEQ ID NO:22)			
hTRAV5p	ATGAAACAAGACCAAAGACTCACTG (SEQ ID NO:23)			
hTRAV8p	TGACCCAGCTTGACAGCCA (SEQ ID NO:24)			
hTRAV26-2p	GGCAATCGCTGAAGACAGAAAG (SEQ ID NO:25)			
hTRAV41p	GAGAACAGGTGTAAGTGCCGCC (SEQ ID NO:26)			
TRAJ				
hAJ53p	TTGGATTCACGGTTAAGAGAGTTC (SEQ ID NO:27)	A	24	59
hAJ48p	TCCAGTCCCAAAGGTTAATTTCTC (SEQ ID NO:28)	A	24	59
hAJ41p	CCGAAGTTGAGTGCATACCCG (SEQ ID NO:29)	A	21	55
hAJ29p	CAAAATCAAGGATGGCTAGAAACAC (SEQ ID NO:30)	A	25	55
hAJ18p	CTTCCAAAGTATAGCCTCCCCAG (SEQ ID NO:31)	A	23	55
hAJ10p	GGTGAGTTTGTTCTCTCTCCC (SEQ ID NO:32)	A	22	57
hAJ5p	CCCAAAGTAAGTGCTCTCCTGCC (SEQ ID NO:33)	A	24	55
hAJ1p	CGGGGAGAAGTGGAAGCTCTGG (SEQ ID NO:34)	A	22	53
hAJ56p	TCAGAGTTATTCCTTTTCCAAATG (SEQ ID NO:35)			
hAJ33p	CGCCCCAGATTAAGTATAGTTGCT (SEQ ID NO:36)			
hAJ24p	GGTCCCTGCTGCAAAGTGC (SEQ ID NO:37)			

Les sondes et amorces selon l'invention peuvent être marquées directement ou indirectement par un composé radioactif ou non radioactif par des méthodes bien connues de l'Homme du Métier, afin d'obtenir un signal détectable
10 et/ou quantifiable ; le marquage des amorces ou des sondes selon l'Invention est réalisé par des éléments radioactifs ou par des molécules non radioactives. Parmi les isotopes radioactifs utilisés, on peut citer le ^{32}P , le ^{33}P , le ^{35}S ou le ^3H . Les entités non radioactives sont sélectionnées parmi les ligands tels que la biotine, l'avidine, la streptavidine, la digoxygénine, les haptènes, les colorants, les agents luminescents tels
15 que les agents radioluminescents, chémoluminescents, bioluminescents, fluorescents, phosphorescents.

Pour éviter l'amplification de séquences voisines hors du locus TCRAD, et donc pour diminuer la non spécificité, l'analyse systématique sur l'ensemble du locus TCRAD humain effectuée pour sélectionner les amorces, à
20 l'étape (b) est, de préférence, effectuée par recherche sur tout le génome humain en utilisant la base de données www.ensembl.org, qui permet de visualiser l'ensemble

des fixations sur le génome humain avec un code couleur de 3 intensités : Rouge = 100 % Vert = 85 Bleu = 70.

Seuls les oligonucléotides candidats reconnaissant le locus TCRAD en rouge et ayant un nombre limité de fixations sur le reste du génome (en vert ou bleu) sont retenus.

Les produits d'amplification par PCR utilisant les amorces précisées dans le Tableau III ci-après fournissent les séquences amplifiées précisées dans la colonne de droite.

Tableau III

oligo up	oligo do	Séquences V amplifiées : SEQ ID NO:38-45
SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:11	CTTGAGAGATGCTGCTGTGTACTACTGCATCCTGAGAGACGGGGGGGGGG
SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:16	CCTTTTGAGGAGCTCCAGATGAAAGACTCTGCCTCTTACCTCTGTGCTGTGAGGAATGGGGGGGG
SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:11	GCGATGTATTTCTGTGCTTACATGAGCCCGGGGGGGGGGGG
SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:11	TATTCTGTATCTGATGATGTCTTTGAGAACAGGTGTAAGTGCCGCCAAAA ATGAAGTGGAGCAGAGTCCTCAGAACCTGACTGCCAGGAAGGAGAATTT ATCACAATCAACTGCAGTTACTCGGTAGGAATAAGTGCCTTACTGCTGCT GCAACAGCATCCAGGAGGAGGCATTGTTTCCTTGTATGCTGAGCTCAG GGAAGAAGAAGCATGGAAGATTAATTGCCACAATAAACATACAGGAAAAG CACAGCTCCCTGCACATCACAGCCTCCCATCCAGAGACTCTGCCGTCTA CATCTGTGCTGTCAGAGGGGGGGGGGGGG
SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:11	ACTCAGCCGTGTACTACTGTCTTCTGGGAGATGGGGGGGGGGGG
SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:16	ACCTGGAGCAGGTCTCCAGCTTGCTGACGTATATTTTTCAAATATGGAC ATGAAACAAGACCAAAGACTCACTGTTCTATTGAATAAAAAGGATAACAT CTGTCTCTGCGCATTGCAGACACCCAGACTGGGGACTCAGCTATCTACTT CTGTGCAGAGAG
SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:11	ACTACTCATCGTCTGTTTCACNGTATCTCTTCTGGTATGTGCAATACCCC AACCAAGGACTCCAGCTTCTCCTGAAGTANNNATCAGGNNCCACCCTGGT TAAAGGCATCAACGGTTTTGAGGCTGAATTTAACAAGAGTGAAACNTCCT TCCACNTGANGAAACCCTCAGCCCATATNAGCGACNCGGCTGAGTACTTC TGTGCTGTGAGTGAT
SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:11	ACCTGGAGCAGGTCTCCAGTTGCTGACGTATATTTTTCAAATATGGACA TGAAACAAGACCAAAGACTCACTGTTCTATTGAATAAAAAGGATAAACAT CTGTCTCTGCGCATTGCAGACACCCAGACTGGGGACTCAGCTATCTACTT CTGTGCAGAGAGT

10

Pour chaque gène Vx, il est préférable de mettre en oeuvre, les couples d'amorces comprenant l'amorce V correspondant audit gène Vx en association avec chacune des amorces J définies ci-dessus (SEQ ID NO:11 à 22). L'étape (b) d'amplification est alors réalisée en parallèle avec les différents couples d'amorces.

15

Selon un autre mode de mise en oeuvre du procédé selon l'invention, l'étape (b) peut avantageusement mettre en oeuvre des amorces supplémentaires pour amplifier en outre au moins l'un des segments suivants : segments D, segments V et J

des chaînes TCR β , γ , δ et éventuellement segments des chaînes des immunoglobulines.

Ainsi, notamment dans le cas des chaînes TCR ou Ig possédant un segment D de diversité, une réaction de PCR entre le gène V et D est effectuée en plus
5 de la réaction V-J commune à tous les réarrangements. Cette étape permet de connaître à la fois le répertoire des segments D et J utilisés en conjonction avec les gènes V. Il en est de même pour les gènes D, dans le cas de l'analyse des chaînes qui ont des D en plus des V et J comme les chaînes TCR bêta et TCR delta et la chaîne lourde des Immunoglobulines.

10 Les ADN polymérases, mises en œuvre à l'étape (b) d'amplification sont de préférence un mélange d'ADN polymérases permettant d'amplifier de très longues molécules d'ADN, du type de celui décrit dans le Brevet américain US 6,410,277 ; un tel mélange d'enzymes présente une activité de correction permettant d'améliorer sensiblement l'élongation. Ainsi, une amplification de plusieurs kb
15 d'ADN permet de détecter les recombinaisons successives ayant eu lieu avec tous les gènes potentiels situés entre les deux amorces utilisées.

Selon un autre mode réalisation avantageux de l'étape (b), la réaction de PCR longue multiplex (LPCR) est effectuée après purification de l'ADN par les techniques classiques de biologie moléculaire ou directement sur un lysat cellu-
20 laire.

Il est cependant préférable de travailler avec l'ADNg le plus pur possible (exempt de protéines telles que les nucléosomes) pour favoriser une amplification optimum des produits de grande taille (> à 10 kb) ; pour cela, il est important de ne pas casser l'ADN génomique.

25 Une fois la purification de l'ADN effectuée (soit par une méthode d'extraction au phénol/chloroforme V/V bien connue en biologie moléculaire, soit avec des troussees commercialisées permettant l'extraction et la purification de l'ADN), celui-ci est directement utilisé pour la LPCR multiplex.

Un tube de réaction (volume réactionnel de 20 à 50 μ l) est composé
30 d'eau ultra pure, de l'enzyme Taq ou du mélange d'enzymes de polymérisation de l'ADN, tel que celui décrit dans le Brevet US 6,410,277 (mélange dénommé LATaq), de $MgCl_2$ (co-facteur de l'enzyme Taq), des dNTP, de l'amorce oligonucléotidique

spécifique du sens de transcription des gènes V à étudier (l'une des amorces de SEQ ID NO:1-10), l'amorce oligonucléotidique spécifique du sens inverse de transcription du segment de gène D ou J (l'une des amorces de SEQ ID NO :11-21) à étudier, de l'ADN à analyser, aussi appelé matrice, à partir de laquelle l'amplification a lieu. Un
5 deuxième oligonucléotide correspondant à une séquence interne du gène V, située en aval de la première amorce V et en amont du RSS du gène V et/ou un deuxième nucléotide J correspondant à une séquence interne du gène J, située en amont de la première amorce J et en aval du RSS du gène J, peuvent être ajoutés à la moitié de la réaction de LPCR pour diminuer le bruit de fond de PCR ; ces oligonucléotides
10 peuvent être marqués ou pas avec un fluorochrome pour permettre la détection directe des produits amplifiés. Le programme du thermocycleur permettant d'effectuer la réaction d'amplification peut être variable en fonction des conditions souhaitées.

On effectue une PCR (étape (b) d'amplification) par couple d'amorces V/J, tel que défini ci-dessus.

15 Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux de l'étape (b) d'amplification, les étapes d'élongation, sont avantageusement incrémentées de 15-20 secondes par cycle supplémentaire d'élongation.

Toutefois, pour permettre l'amplification de fragments longs d'ADN, il est nécessaire (étape (b)) :

20 . d'exposer l'ADN génomique à amplifier à des températures supérieures à 90°C (dénaturation) pendant des temps très courts (de l'ordre de 10 à 30 secondes), et ce pour éviter l'acidification du milieu et la dégradation de l'ADN,

. de tenir compte de la « fatigue » de l'ADN polymérase mise en œuvre, en incrémentant de 15-20 secondes par cycle supplémentaire l'étape
25 d'élongation, notamment à partir du milieu de la PCR,.

Un exemple, non limitatif, permettant l'amplification de produits de l'ordre de 10 kb à 20 kb, est décrit ci-après :

- Dénaturation initiale 1-2 minutes à 94°C
- 15 cycles successifs comprenant : une étape de dénaturation : 5 à
30 30 secondes à 90-94°C, une étape d'hybridation des amorces : 15-30 secondes à 58-62°C et une étape d'élongation : 14 à 20 minutes à 68-72°C et

- 15 cycles successifs comprenant : une étape de dénaturation : 5 à 30 secondes à 90-94°C, une étape d'hybridation des amorces : 15-30 secondes à 58-62°C et une étape d'élongation : 14 à 20 minutes à 68-72°C + 15-20 secondes additionnelles à chaque cycle supplémentaire et

5 - 1 cycle final d'élongation de 10 minutes à 72°C.

Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, l'étape (c) de séparation des fragments d'ADN amplifiés est effectuée par migration électrophorétique sur gel d'agarose ou de polyacrylamide, de préférence en champ pulsé.

10 Les conditions de séparation des produits de PCR peuvent varier en fonction des conditions souhaitées. Voici une condition permettant de séparer des produits de l'ordre de 15 kb par migration sur gel d'électrophorèse d'agarose en TBE 1X (cette étape est bien connue dans le domaine de l'art) :

Dépôt de 5-20 µl de produit de LPCR sur un gel d'agarose 1,2 %
15 (P/V), migration 100-150 volts pendant 8 h avec un générateur. Il est possible d'utiliser une migration en champs pulsés pour améliorer la séparation des produits de grande taille.

Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, l'étape (c) de séparation des fragments d'ADN amplifiés est effectuée par séparation
20 en microcapillaire sur bioanalyseur. Plus précisément, pour séparer des fragments de LPCR de taille supérieure à 10 kb, on peut utiliser une migration en microcapillaire Bio-analyseur AGILENT Technologies. On peut envisager dans un tel cas, de travailler avec des amorces marquées avec un fluorochrome (par exemple le Cy-5) pour augmenter le signal de détection des fragments amplifiés, à l'étape (d) de détec-
25 tion. La puce AGILENT est préparée et utilisée d'après les indications du constructeur, dépôt de 1 µl du produit de PCR, quantification conformément au guide d'utilisation de l'appareil.

De manière surprenante, la combinaison des éléments suivants de l'étape (b) :

- 30
- le choix des séquences des amorces permettant d'étudier les réarrangements des récepteurs antigéniques chez l'homme ;
 - le programme du thermocycleur lors des réactions d'amplification ;

- le choix des enzymes utilisées pour améliorer l'amplification des fragments de grande taille ;

et le protocole de séparation des fragments amplifiés de l'étape (c), permettent effectivement une évaluation quantitative des recombinaisons à détecter.

5 Dans ce contexte il est possible de détecter entre 1 et 11 réarrangements par réaction PCR et pour visualiser 100 % des réarrangements effectués dans la région J, un minimum de 11 PCR, pour un gène V donné est suffisant.

Selon un autre mode de mise en œuvre dudit procédé, l'étape (d) de détection peut être avantageusement réalisée à l'aide de l'une des méthodes suivantes :

10 - par transfert de type Southern des produits amplifiés sur membranes de nylon, suivi d'une révélation après hybridation avec une ou plusieurs sondes nucléotidiques spécifiques d'une séquence interne au produit amplifié (sondes de SEQ ID NO:22-37, notamment) marquées avec un isotope radioactif ou un fluorochrome, ; de manière plus précise, cette méthode comprend le transfert de type
15 Southern sur membrane de nylon ou de nitrate de cellulose par capillarité buvard, par exemple avec un tampon 20X SSC, cross Linkage de l'ADNg sur la membrane après exposition aux UV 700 kJoules (étape bien connue dans le domaine de l'art), préhybridation avec du milieu d'hybridation dans des conditions permettant de diminuer le bruit de fond non spécifique, hybridation avec une ou plusieurs sondes
20 d'oligonucléotides internes marquées radioactivement (méthode T4 kinase + ³²PgammaATP) permettant de révéler de manière spécifique les produits de PCR et validation de la spécificité des réarrangements en mesurant la taille des produits de PCR. La quantification relative de l'intensité de chaque bande d'ADN correspondant aux différents réarrangements en utilisant un imageur et un logiciel adapté comme le
25 Quantity-One de la société Biorad.

- par utilisation d'une base marquée (par un isotope radioactif ou un fluorochrome) lors de l'amplification puis par mesure de son incorporation directement dans le gel,

30 - par utilisation d'agent marquant l'ADN (tels que bromure d'éthidium, SybrGreen I ou autres) lors de la migration, et détection après excitation aux UV ou autre longueur d'onde appropriée

- par utilisation d'oligonucléotides marqués par des fluorochromes ou autres moyens de révélation enzymatiques (ex. Avidine-biotine, peroxydase...) lors de l'amplification.

Tout autre méthode de détection peut également être envisagée.

5 Selon une disposition avantageuse de ce mode de mise en œuvre, les sondes sont avantageusement sélectionnées dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO:22-37, telles que définies dans le Tableau II.

10 Un réarrangement donné est défini à partir des produits d'amplification : d'une part, d'après la distance de leur migration et d'autre part, par hybridation avec des sondes internes spécifiques. Il est possible de détecter individuellement plusieurs réarrangements dans une seule réaction. En combinant un nombre suffisant de réactions, il est possible de quantifier l'ensemble des réarrangements V(D)J constituant le répertoire immunitaire et ceci, directement au niveau de l'ADN génomique.

15 Avantageusement, le procédé selon l'invention peut être mis en œuvre sur différents types d'échantillons biologiques : cellules en culture, lignées cellulaires, échantillons provenant de biopsies, de microdissection, de prélèvements sanguins, de cellules triées ; de préférence sur des prélèvements sanguins.

20 Le procédé selon l'invention, tel que défini ci-dessus, permet notamment l'analyse totale ou partielle du répertoire immunitaire par l'analyse des combinaisons V(D)J, notamment par réalisation d'étapes (b) d'amplification en parallèle avec différents couples d'amorces. Cette méthode est à la fois qualitative et quantitative. La détection des recombinaisons génétiques V(D)J permet de suivre le répertoire immunitaire spécifique et d'en estimer sa diversité de manière dynamique
25 dans différentes conditions pathologiques et suite à différents traitements. Basée sur le principe de l'amplification de l'ADN, cette technique permet de détecter de manière précoce et avec une faible quantité de matériel biologique, le répertoire immunitaire.

30 La mesure de ces répertoires constitue un défi difficile au vu du grand nombre de combinaisons du répertoire V(D)J. De plus, chaque récepteur est constitué de deux chaînes, ainsi le répertoire total pour un récepteur donné est le produit de la diversité structurale de chacune des chaînes le constituant. Les nombres de formes possibles de récepteurs Ig ou TCR sont estimés être de l'ordre de 10^{14} à

10¹⁸ récepteurs potentiels différents. Cependant, l'évaluation des répertoires demeure un enjeu d'importance pour évaluer la réponse immunitaire spécifique dans les conditions physio-pathologiques telles que les réponses aux infections, au développement de cancer, aux allergies, aux maladies auto-immunes, aux déficits immunitaires et à leur reconstruction,...

D'une part, on peut considérer que la diversité du répertoire immunitaire est en relation avec la santé de l'organisme. Un répertoire faiblement diversifié peut correspondre à un déficit immunitaire rendant l'organisme sensible à différentes pathologies. Dans un certain nombre de domaines médicaux et cliniques, il est important de suivre les variations des répertoires. On peut citer les situations de lymphopénies héréditaires (déficits immunitaires congénitaux) ou infectieuses (le SIDA par exemple), ou provoquées comme dans le cas des ablations du système immunitaire par irradiation corporelle dans le cas des traitements de cancers du sang (leucémies, lymphomes, etc).

D'autre part, un certain nombre d'essais thérapeutiques visent à induire une réponse immunitaire spécifique. C'est le cas par exemple des divers protocoles de vaccinations anti-microbiennes et anti-tumorales, utilisant diverses voies d'injections, de formulation, d'adjuvants, de différents vecteurs, etc. Dans d'autres cas, c'est une répression de la réponse immunitaire qui est recherchée comme par exemple, pour contrecarrer les syndromes auto-immuns et lutter contre les manifestations allergiques.

Dans tous ces cas, le procédé selon l'invention permet d'une part de mesurer le répertoire des récepteurs des antigènes au cours des différentes phases des maladies, et d'autre part d'évaluer l'action stimulante ou répressive de molécules dans l'objectif d'en dériver des médicaments modulateurs de la réponse immunitaire spécifique.

En conséquence la présente invention a également pour objet :

* un procédé de suivi d'un traitement d'une pathologie dans laquelle le répertoire immunitaire est initialement modifié, chez un sujet concerné, lequel procédé est caractérisé :

- en ce qu'il met en oeuvre le procédé d'évaluation du répertoire immunitaire, tel que défini ci-dessus en début de traitement et

- en ce que ledit procédé d'évaluation est réitéré à différentes phases du traitement et

- en ce que le profil du répertoire immunitaire obtenu à chaque fois est comparé à celui d'un répertoire immunitaire standard, et ce afin d'évaluer la
5 réponse dudit individu audit traitement.

* un procédé de mesure du répertoire des récepteurs des antigènes au cours des différentes phases d'une pathologie dans laquelle le répertoire immunitaire est modifié, chez un sujet concerné, lequel procédé est caractérisé :

- en ce qu'il met en oeuvre le procédé d'évaluation du répertoire
10 immunitaire, tel que défini ci-dessus à différentes phases de la pathologie et

- en ce que le profil du répertoire immunitaire obtenu à chaque fois est comparé à celui d'un répertoire immunitaire standard, et ce afin d'évaluer l'évolution de ladite pathologie.

La présente invention a en outre pour objet un kit d'évaluation
15 quantitative du répertoire immunitaire d'un individu, caractérisé en ce qu'il comprend outre les tampons et réactifs usuels pour mettre en oeuvre une PCR, des amorces et des sondes telles que définies ci-dessus.

Les pathologies concernées sont aussi bien des tumeurs des lymphocytes et cellules apparentées aux lymphocytes que toute autre pathologie impliquant la
20 réponse immunitaire, telles que des maladies virales, des maladies auto-immunes, des états physiopathologiques, des immunodéficiences, des allergies ou des anomalies des mécanismes de recombinaison V(D)J.

La présente invention a également pour objet des amorces susceptibles d'être mises en oeuvre dans un procédé tel que défini ci-dessus, caractérisées en
25 ce qu'elles sont sélectionnées dans le groupe constitué par les amorces oligonucléotidiques répondant aux séquences SEQ ID NO :1-21.

La présente invention a en outre pour objet des sondes de détection susceptibles d'être mises en oeuvre dans un procédé tel que défini ci-dessus, caractérisées en ce qu'elles sont sélectionnées dans le groupe constitué par les sondes oligonucléotidiques de séquences SEQ ID NO:22-37.
30

La présente invention a également pour objet l'utilisation des amorces d'amplification et des sondes de détection telles que définies ci-dessus pour l'évaluation quantitative du répertoire immunitaire d'un individu.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore
5 d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en œuvre du procédé objet de la présente invention ainsi qu'aux dessins annexés, dans lesquels :

- la figure 1 représente les résultats d'un procédé selon l'invention (longue PCR multiplex) effectué pour évaluer le réarrangement V8-J α dans le
10 thymus : analyse globale de la région J α . Les réactions PCR multiplex sont mises en œuvre sur l'ADNg en utilisant les amorces V α de la famille hV8 (voir Tableau I) en combinaison avec 11 amorces J α différentes (voir Tableau I : SEQ ID NO :11-21). Les produits sont analysés par Southern blot à l'aide de sondes spécifiques de la famille V8 (SEQ ID NO:24). Chaque piste correspond à une réaction PCR indivi-
15 duelle ; chaque bande correspondant à un réarrangement avec le segment J α indiqué sur la gauche de la piste. Compte tenu du fait que l'amplification par PCR est plus efficace sur des produits de petite taille que sur des produits de grande taille, les bandes situées à la base de chaque piste sont plus intenses. Les astérisques indiquent les produits non-spécifiques déterminés par la distance de migration. Représentation
20 de la région J (pas à l'échelle) : les 11 amorces choisies sont réparties sur la région J α comme indiqué. Les points indiquent la position des amorces et des sondes J α ; les lignes correspondantes indiquent l'étendue des segments J α détectables dans chaque piste. Les lignes en pointillés indiquent les pseudogènes J α non transcrits.

- la figure 2 illustre le rôle de la localisation des gènes V α dans la
25 répartition du réarrangement avec la région J α . Les réarrangements V-J α sont analysés par PCR multiplexe sur de l'ADN extrait à partir de thymus total de nourrissons de 6 jours. Les amorces spécifiques des gènes V α sont indiquées et correspondent aux amorces décrites dans le Tableau ci-dessus ; ces amorces sont utilisées avec 7 amorces J indiquées au dessus de chaque piste (voir également les séquences dans le Tableau I
30 ci-dessus).

- la figure 3 illustre une représentation de la matrice du répertoire humain V-J α , le réarrangement dépendant de la position desdits gènes sur le locus. Figure 3a : panneau représentatif de la quantification relative d'un réarrangement V-J α , par intégration des signaux des produits PCR de la figure 2. Cette intégration est réalisée sur les produits de PCR dont la réaction PCR est arrêtée pendant la phase exponentielle et après vérification que l'intégration est linéaire. L'axe des Z illustre l'intensité de signal relatif des réarrangements détectés ; l'axe des J représente l'ordre relatif des segments J α étudiés ; les gènes V α étudiés sont indiqués sur l'axe V. Les flèches illustrent les tendances de progression des réarrangements V α -J α . Figure 3b gauche : analyse de l'utilisation de la région V α globale par intégration des 7 segments J α étudiés à la figure 3a ; figure 3b droite : analyse de l'utilisation de la région J α globale par intégration des 10 gènes V α étudiés à la figure 3a.

- la figure 4 illustre le principe du procédé selon l'invention, appliqué à la détection des recombinaison V8-J : les amorces mises en œuvre sont les suivantes : SEQ ID NO :5 (hTRAV8) et SEQ ID NO :13 (hTRAJ41) ; la sonde de détection est la sonde hAJ41p (SEQ ID NO:29).

- la figure 5 représente une comparaison entre le score RSS des gènes V α humains, la position dans le locus et le segment J utilisé principalement.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

EXEMPLE 1 : Matériel et méthodes

- Nomenclature :

Les nomenclatures pour les gènes TRAV (V α) et les segments TRAJ (J α) sont conformes à celles de la base IMGT (<http://imgt.cines.fr>). La carte détaillée des locus TCRAD humain et de souris sont accessibles sur le site IMGT à l'adresse suivante :

http://imgt.cines.fr/textes/IMGTrepertoire/LocusGenes/locus/human/TRA/Hu_TRAm ap.html.

Les séquences utilisées pour établir chaque amorce ont été extraites à partir de la base de données Genbank n° d'accès NG_001332.

- Extraction d'ADNg

Un ensemble de précautions est à suivre pour préserver l'intégrité de l'ADN génomique (ADNg) notamment la taille, la pureté, l'absence de contamination en RNA et en sel. Le rendement d'amplification par PCR de long brin d'ADN est conditionné par ces critères. Globalement, il faut respecter les précautions définies pour la purification de l'ADNg utilisé pour la technique de transfert de type Southern (voir Sambrook J., Fritsch EF., Maniatis T. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. Second Edition. Cold Spring Harbor, New York, EUA).

- Il faut éviter de vortexer l'ADNg, plus on le vortex et plus il se casse.
- Il faut préserver l'ADNg dans un tampon légèrement basique (ex : TRIS 10 mM ; pH entre 7,5 et 8,5)
- Il faut éviter de faire des pipetages brusques (casse l'ADN au niveau de la pointe du cône)
- L'ADNg est conservé à 4°C pour éviter sa dégradation
- En cas de conservation prolongée, mettre l'ADNg dans de l'alcool.

Il est préconisé un Kit d'extraction Quiagen : Genomic-Tip System.

<http://www1.qiagen.com/Products/GenomicDnaStabilizationPurification/QiagenGenomicTipSystem/>

Ce Kit permet de préserver des fragments d'ADN de l'ordre de 150 Kb.

Le type de protocole d'extraction utilisé par le Kit peut être employé pour travailler sur différentes sources de cellules comme par exemple le sang, la culture cellulaire, des cellules issues de tri cellulaire, des tissus (thymus, ganglions lymphatiques... liste non exhaustive). Dans le cas de tissus, avant de traiter avec le kit, 1) pour les tissus peu cohésifs (thymus, ganglions, ...) on tente d'individualiser les cellules par un traitement modéré à la trypsine – EDTA, 2) pour les tissus hautement cohésifs (type muscle par exemple) on réduit en poudre le tissu par un traitement avec un pilon à froid en présence de neige carbonique.

- Echantillons d'ADN, analyse par PCR multiplex :

L'ADN génomique humain de 3 thymus entiers, (un nourrisson de sexe féminin de 6 jours, deux nourrissons de sexe masculin de 10 et 90 jours) est

extrait et amplifié comme décrit dans Gallagher et al. (28), la PCR multiplex et le Southern blot sont réalisés comme décrits dans Mancini et al. (27).

5 Brièvement, la PCR multiplex s'effectue à l'aide d'amorces situées en amont de V et en aval de J (voir Tableau I ci-dessus) qui permettent d'amplifier jusqu'à 10 kb. Après chaque réaction, la spécificité des produits de PCR est vérifiée par une hybridation de sondes V (SEQ ID NO:22-26) et J internes (SEQ ID NO :27-37) (voir Tableau II ci-dessus) et par analyse informatique de la distance de migration.

10 Les amplifications sont réalisées avec 1,3 unité par réaction de "expend high fidelity PCR system" (Roche Diagnostics, Meylan, France) dans les conditions suivantes :

- Dénaturation initiale 1-2 minutes à 94°C

- 15 cycles successifs comprenant : une étape de dénaturation : 5 à 30 secondes à 90-94°C, une étape d'hybridation des amorces : 15-30 secondes à 58-62°C et une étape d'élongation : 14 à 20 minutes à 68-72°C et

15 - 15 cycles successifs comprenant : une étape de dénaturation : 5 à 30 secondes à 90-94°C, une étape d'hybridation des amorces : 15-30 secondes à 58-62°C et une étape d'élongation : 14 à 20 minutes à 68-72°C + 15-20 secondes additionnelles à chaque cycle supplémentaire et

- 1 cycle final d'élongation de 10 minutes à 72°C.

20 Toutes les amorces sélectionnées (voir Tableau 1 : SEQ ID NO :1-21) présentent une efficacité d'amplification de 98 % permettant une comparaison relative directe.

25 La séparation des fragments d'ADN se fait par migration électrophorétique (gel d'agarose, de polyacrylamide, séparation en microcapillaires sur bioanalyseur AGILENT ou encore migration en champ pulsé).

30 La révélation peut être réalisée par les techniques suivantes qui ne sont pas limitatives : i) transfert de type Southern sur membrane de nylon et hybridation de sondes marquées (radio isotopes ou fluorochromes), ii) utilisation d'une base marquée lors de l'amplification et mesure de son incorporation directement dans le gel, iii) utilisation d'un agent marquant l'ADN (BET ou Cybergreen) lors de l'amplification ou encore iv) utilisation lors de l'amplification, d'oligonucléotides

marqués par des fluorochromes ou autres moyens de révélation enzymatique (avidine-biotine, peroxydase).

- Conception des amorces :

Les amorces spécifiques des segments de gènes V α et J α du locus TCRAD humain ont été sélectionnées pour leur spécificité de séquences, comme précisé ci-dessus, à l'aide du logiciel NTI Vector-8suite, Informax. L'hybridation non spécifique est vérifiée sur Blast dans le site www.ensembl.org. Les amorces sélectionnées correspondent à celles illustrées au Tableau I ci-dessus.

Plus précisément :

10 . **pour les gènes V** : au niveau génomique, on retrouve les éléments correspondant à une région régulatrice de type promoteur avant le gène, une région codant le peptide signal ou « leader » (Exon1), un intron et une région codant la région variable (Exon 2) et une région RSS non traduite assurant la spécificité spatiale des réarrangements. Ainsi, l'amorce variable (V) est choisie pour s'hybrider à une
15 région codante ou non, mais dans tous les cas en amont de la séquence RSS du gène V.

. **pour les gènes J** : l'amorce est choisie en aval (correspondant au 3' du brin transcrit) du gène J à étudier ; il peut être dans la région codante du gène J ou dans une région non codante entre deux gènes J.

20 **EXEMPLE 2 : Analyse de la région J humaine comparativement à son homologue murin**

Des PCR multiplex (conditions de l'exemple 1) sont réalisées en combinant des amorces d'un gène V individuel et 11 amorces différentes en aval de AJ (J1, J5, J10, J18, J24, J29, J33, J41, J48, J53, J56) couvrant la région J, comme
25 représenté sur la figure 1. Chaque colonne correspond à une réaction de PCR individuelle et chaque bande correspond à un réarrangement de V avec un segment J, lequel est indiqué en chiffre à gauche de chaque piste.

Détermination du nombre de segments J potentiels utilisés dans les réarrangements V-J.

30 Trois des six membres de la famille V8 humaine (V8.2, V8.4 et V8.6) respectivement situé à 701, 653, et 569 kb du gène C α , sont amplifiés par la

technique de PCR multiplex décrite ci-dessus, à l'aide des amorces précédemment définies.

Les résultats représentés sur la figure 1 montrent que les membres V8 humains réarrangent avec les segments J allant de J α 61 à J α 3. La totalité de la région J est donc accessible à la recombinaison.

Détermination des segments de gènes non fonctionnels.

Les segments de gènes non fonctionnels des loci de TCR sont également appelés "pseudogènes de réarrangement". Le procédé selon la présente invention permet de caractériser ces pseudogènes. Aussi bien chez la souris que chez l'homme certains segments ont été identifiés comme n'étant pas fonctionnels (pseudogènes).

Chez la souris, 16 gènes J α sur 60 sont des pseudogènes (24, 29), tandis que chez l'homme jusqu'à présent seulement les pseudogènes J α 51, 59 et 60 avaient été caractérisés (25).

Comme le montre la figure 1, cinq segments J α humains supplémentaires sont incapables de donner un réarrangement avec des membres de la famille V8. Ces cinq segments J α sont : J α 55, J α 25, J α 19, J α 2 et J α 1. On observe la même chose avec d'autres familles V (figure 2).

Par ailleurs, les gènes de non réarrangement J α 46, 41, 36, 29, 20, 14, 8 et 3 décrits chez la souris sont fonctionnels chez l'homme. La région J α humaine contient plus de segments J α fonctionnels, capables de réarrangements, que la souris, ce qui implique un répertoire J plus diversifié.

EXEMPLE 3 : Analyse qualitative des réarrangements V-J humains

Quatre gènes V α les plus distants de la région J α (V1, V2, V3 et V5) et cinq gènes V α proximaux à la région J α (V26.2, V35, V38, V40, V41, situés entre -345 et -227 kb par rapport au gène C α) ont plus particulièrement été étudiés.

La famille multigénique V8 est utilisée comme contrôle d'utilisation de la région J du fait qu'elle est située au milieu du locus et qu'elle est composée des membres situés à -701, -653, -569 kb de la région C α .

Des amorces spécifiques des gènes V (voir Tableau I) sont utilisées en combinaison avec 7 amorces spécifiques de la région J α (53, 48, 41, 29, 18, 10 et 5) (figure 2). Pour faciliter l'analyse, un seul gène V à la fois est soumis au réarran-

gement avec la région J α . L'étude est réalisée dans les conditions de PCR multiplex de l'exemple 1 (voir également la figure 4).

La figure 2 représente le profil de réarrangement des gènes V pris individuellement avec la région J α . Celle-ci permet de constater que les gènes V proximaux par rapport à la région J α se réarrangent principalement avec les gènes J en 5' les plus proximaux (V26.2, V 35, V38, V40 et V41 avec les segments J α 53, J α 48, J α 41, J α 29).

Ces résultats montrent également que les gènes V distaux par rapport à la région J α se réarrangent principalement avec les segments J α situés au centre et dans la partie 3' de cette région.

Le gène V8 contrôle permet de vérifier que la recombinaison est homogène quelle que soit la région J α . La figure 4 montre les recombinaisons obtenues avec les amorces SEQ ID NO:5 et 13 et la sonde de détection SEQ ID NO :29.

Les réarrangements V-J sont donc dépendants de la localisation des segments sur les chromosomes et chaque gène V se réarrange avec une quantité restreinte de segments J.

EXEMPLE 4 : Analyse quantitative des réarrangements V-J humains

Les réarrangements V-J peuvent, dans les conditions de l'exemple 1, être analysés de façon quantitative à l'aide d'une quantification relative de l'intensité de chaque bande d'ADN correspondants aux différents réarrangements, en utilisant un imageur et un logiciel adapté tel que le Quantity-One (Biorad).

La figure 3a présente une représentation matricielle du répertoire V-J α humain. L'axe Z présente l'intégration de l'intensité relative des réarrangements détectés, l'axe J représente l'ordre d'analyse des segments et l'axe V représente les gènes V étudiés allant de la zone proximal à la zone distale.

On constate sur cette figure que les gènes situés entre V41 et V26.2 (situé à 345kb du locus TCRD) réarrangent 3 à 7 fois plus que ceux compris entre V5 et V1 situés respectivement à 798 et 925kb. Concernant la région J, les gènes en 5' les plus proximaux se réarrangent 3 à 7 fois plus que les gènes distaux. Enfin, la famille multigénique V8 se combine à fréquence égale avec l'ensemble des segments de gènes J, quelque soit leur position, confirmant l'hypothèse que les réarrangements sont fonction de la position des gènes sur le locus.

La figure 3b représente pour les gènes V (à gauche) et les gènes J (à droite) l'utilisation globale de chacun des segments.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. FINK P.J. et al., *Journal of Experimental Medicine*, 1978, **148**, 766-775.
- 5 2. DAVIS M.M. et al., *Nature*, 1988, **334**, 395-402.
3. SAITO H. et al., *Nature*, 1984, **309**, 757-762.
4. GARCIA K.C. et al., *Annu Rev Immunol*, 1999, **17**, 369-397.
5. ALLISON T.J. et al., *Nature*, 2001, **411**, 820-824.
6. HENNECKE J. et al., *Cell*, 2001, **104**, 1-4.
- 10 7. HAMROUNI A. et al., *J Exp Med*, 2003, **197**, 601-614.
8. DIETRICH P.Y. et al., *J Immunol*, 2003, **170**, 5103-5109.
9. BASSING C.H. et al., *Cell*, 2002, **109**, suppl:S45-55.
10. CHIEN Y.H. et al., *Nature*, 1984, **309**, 322-326.
11. SLECKMAN B.P. et al., *Immunol Rev*, 1998, **165**, 121-130.
- 15 12. CAPONE M. et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**, 12522-12527.
13. VON BOEHMER H. et al., *Curr Opin Immunol*, 1999, **11**, 135-142.
14. GELLERT M., *Adv Immunol*, 1997, **64**, 39-64.
15. OETTINGER M.A., *Science*, 1990, **248**, 1517-1523.
16. GELLERT M., *Annu Rev Biochem*, 2002, **71**, 101-132.
- 20 17. McBLANE J.F. et al., *Cell*, 1995, **83**, 387-395.
18. VAN GENT D.C. et al., *Cell*, 1996, **85**, 107-113.
19. HESSE J.E. et al., *Genes Dev*, 1989, **3**, 1053-1061.
20. COWELL L.G. et al., *J Exp Med*, 2003, **197**, 207-220.
21. CABANIOLS JP. et al., *J Exp Med*, 2001, **194**, 1385-1390.
- 25 22. SAITO T. et al., *J Exp Med*, 1988, **168**, 1003-1020.
23. CASROUGE A. et al., *J Immunol*, 2000, **164**, 5782-5787.
24. PASQUAL N. et al., *J Exp Med*, 2002, **196**, 1163-1173.
25. KOOP B.F. et al., *Genomics*, 1994, **19**, 478-493.
26. GLUSMAN G. et al., *Immunity*, 2001, **15**, 337-349.
- 30 27. MANCINI S.J. et al., *J Immunol*, 2001, **167**, 4485-4493.
28. GALLAGHER M. et al., *J Immunol*, 2001, **167**, 1447-1453.
29. GAHERY-SEGARD H. et al., *Immunogenetics*, 1996, **44**, 298-305.

30. KRANGEL M.S., *Nat Immunol*, 2003, **4**, 624-630.
31. YANCOPOULOS G.D. et al., *Cell*, 1986, **44**, 251-259.
32. MOSTOSLAVSKY R. et al., *Nat Immunol*, 2003, **4**, 603-606.
33. STRAHL B.D. et al., *Nature*, 2000, **403**, 41-45.
- 5 34. McBLANE et al., *Curr Biol*, 2000, **10**, 483-486.
35. HSIEH C.L. et al., *Embo J*, 1992, **11**, 315-325.
36. SPICUGLIA S. et al., *Mol Cell*, 2002, **10**, 1479-1487.
37. HUANG C. et al., *J Immunol*, 2001, **166**, 2597-2601.
38. WANG F. et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**, 11834-11839.
- 10 39. DAVODEAU F. et al., *Embo J*, 2001, **20**, 4717-4729.
40. McMURRY M.T. et al., *Science*, 2000, **287**, 495-498.
41. MAUVIEUX L. et al., *Eur J Immunol*, 2001, **31**, 2080-2086.
42. VILLEY I. et al., *Immunity*, 1996, **5**, 331-342.
43. ARSTILA T.P. et al., *Science*, 1999, **286**, 958-961.
- 15 44. BASSING C.H. et al., *Nature*, 2000, **405**, 583-586.
45. LEE A.I. et al., *PloS Biol* 1:E1, 2003.
46. HODGES E et al., *J Clin Pathol*, 2003, **56**, 1-11.

REVENDECATIONS

1°) Procédé d'évaluation quantitative d'un réarrangement ou d'une d'une recombinaison génétique ciblée d'un individu, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend au moins :

5 (a) l'extraction de l'ADN génomique humain, à partir d'un échantillon biologique,

(b) l'amplification d'un segment dudit ADN génomique, de taille comprise entre quelques centaines de paires de bases et plusieurs dizaines de kb, par PCR multiplex, en présence :

10 * d'un ou plusieurs couples d'amorces, sélectionnées de manière à répondre aux caractéristiques suivantes :

- au moins l'une desdites amorces de l'un desdits couples d'amorces, s'hybride en amont et/ou à l'extrémité 5' d'un gène Vx à amplifier, susceptible d'intervenir dans ledit réarrangement génétique ;

15 - au moins l'autre desdites amorces de l'un desdits couples d'amorces s'hybride en aval et/ou à l'extrémité 3' d'un gène Jy à amplifier, susceptible d'intervenir dans ledit réarrangement génétique ;

* et d'une ADN polymérase ou d'un mélange d'ADN polymérases permettant l'amplification de segments d'ADN génomique de taille comprise entre 20 quelques centaines de paires de bases et plusieurs dizaines de kb, de préférence de taille supérieure à 10 kb et ayant une activité de correction permettant d'améliorer sensiblement l'élongation ;

ladite amplification comprenant outre l'étape de dénaturation initiale, des cycles de dénaturation, d'hybridation et d'élongation et, dans 25 lesquels les étapes d'élongation sont effectuées au moins pendant 10 minutes à 68°C-72°C ;

(c) la séparation des fragments d'ADNg amplifiés et

(d) la détection des segments réarrangés ou recombinés.

2°) Procédé d'évaluation quantitative du répertoire immunitaire d'un 30 individu par réarrangement génétique selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend :

(a) l'extraction de l'ADN génomique humain, à partir d'un échantillon biologique,

(b) l'amplification d'un segment dudit ADN génomique, de taille comprise entre quelques centaines de paires de bases et plusieurs dizaines de kb, par
5 PCR longue multiplex, en présence :

* d'un ou plusieurs couples d'amorces, sélectionnées de manière à répondre aux caractéristiques suivantes :

- au moins l'une desdites amorces de l'un desdits couples d'amorces, dénommée amorce V, s'hybride de manière spécifique avec une région située en
10 amont de la séquence RSS d'un gène Vx à amplifier, correspondant à un segment V du domaine variable de la chaîne α d'un récepteur des cellules T (TCRAD) ;

- au moins l'une desdites amorces de l'un desdits couples d'amorces, dénommée amorce J s'hybride de manière spécifique avec une région située en aval de la séquence RSS d'un gène Jy à amplifier, avec l'extrémité 3' dudit gène Jy à
15 amplifier ou dans ledit gène Jy à amplifier, correspondant à un segment J de la chaîne α d'un récepteur des cellules T ;

* et d'une ADN polymérase ou d'un mélange d'ADN polymérases permettant l'amplification de segments d'ADN génomique de taille comprise entre quelques centaines de paires de bases et plusieurs dizaines de kb et ayant une activité
20 de correction permettant d'améliorer sensiblement l'élongation ;

ladite amplification comprenant outre l'étape de dénaturation initiale, des cycles de dénaturation, d'hybridation et d'élongation et, dans lesquels les étapes d'élongation sont effectuées au moins pendant 10 minutes à 68°C-72°C ;

(c) la séparation des fragments d'ADNg amplifiés et

25 (d) la détection des segments V(D)J recombinés.

3°) Procédé selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce qu'à l'étape (b) d'amplification, la sélection des amorces est effectuée :

- par analyse systématique de l'ensemble du locus concerné et notamment du locus TCRAD humain à l'aide d'un logiciel convenable,

30 - sélection des amorces dont l'extrémité 3'OH est complémentaire uniquement de la région d'intérêt,

- élimination des amorces formant des auto-dimères ou des épingles à cheveux stables, notamment par une analyse avec un logiciel convenable et

- élimination des couples d'amorces formant des hybrides entre eux.

5 4°) Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que les amorces V et J des couples d'amorces V/J sont sélectionnées dans le groupe constitué par les amorces de séquences SEQ ID NO :1-21.

10 5°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que l'étape (b) d'amplification met avantageusement en œuvre des amorces supplémentaires pour amplifier en outre au moins l'un des segments suivants : segments D, segments V et J des chaînes TCR β , γ , δ et éventuellement segments des chaînes des immunoglobulines.

15 6°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'à l'étape (b) d'amplification, la réaction de PCR longue multiplex (LPCR) est effectuée après purification de l'ADN ou directement sur un lysat cellulaire.

7°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'à l'étape (b) d'amplification les étapes d'élongation sont incrémentées de 15-20 secondes par cycle supplémentaire d'élongation.

20 8°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que l'étape (c) de séparation des fragments d'ADN amplifiés est effectuée par migration électrophorétique sur gel, de préférence en champ pulsé.

9°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que l'étape (c) de séparation des fragments d'ADN amplifiés est effectuée par séparation en microcapillaire.

25 10°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que l'étape (d) de détection peut être avantageusement réalisée par transfert de type Southern des produits amplifiés sur membranes de nylon, suivi d'une révélation après hybridation avec une ou plusieurs sondes nucléotidiques marquées avec un isotope radioactif ou un fluorochrome

30 11°) Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que les sondes sont avantageusement sélectionnées dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO:22-37.

12°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que l'étape (d) de détection peut être avantageusement réalisée par utilisation d'une base marquée (par un isotope radioactif ou un fluorochrome) lors de l'amplification puis par mesure de son incorporation directement dans le gel.

5 13°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que l'étape (d) de détection peut être avantageusement réalisée par utilisation d'agent marquant l'ADN lors de la migration, et détection après excitation aux UV ou autre longueur d'onde appropriée

10 14°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que l'étape (d) de détection peut être avantageusement réalisée par utilisation d'amorces marquées par des fluorochromes ou autres moyens de révélation enzymatiques lors de l'amplification.

15 15°) Procédé de suivi d'un traitement d'une pathologie dans laquelle le répertoire immunitaire est initialement modifié, chez un sujet concerné, lequel procédé est caractérisé :

- en ce qu'il met en oeuvre le procédé d'évaluation du répertoire immunitaire, selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, en début de traitement,
- en ce que ledit procédé d'évaluation est réitéré à différentes phases du traitement et

20 - en ce que le profil du répertoire immunitaire, obtenu à chaque fois, est comparé à celui d'un répertoire immunitaire standard, et ce afin d'évaluer la réponse dudit sujet audit traitement.

25 16°) Procédé de mesure du répertoire des récepteurs des antigènes au cours des différentes phases d'une pathologie dans laquelle le répertoire immunitaire est modifié, chez un sujet concerné, lequel procédé est caractérisé :

- en ce qu'il met en oeuvre le procédé d'évaluation du répertoire immunitaire, selon l'une quelconque des revendications 1 à 14 à différentes phases de la pathologie et

30 - en ce que le profil du répertoire immunitaire obtenu à chaque fois est comparé à celui d'un répertoire immunitaire standard, et ce afin d'évaluer l'évolution de ladite pathologie.

17°) Kit d'évaluation quantitative du répertoire immunitaire d'un individu, caractérisé en ce qu'il comprend outre les tampons et réactifs usuels pour mettre en oeuvre une PCR, des amorces et des sondes telles que définies aux revendications 1 à 14.

5 18°) Amorces susceptibles d'être mises en oeuvre dans un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 16, caractérisées en ce qu'elles sont sélectionnées dans le groupe constitué par les amorces oligonucléotidiques répondant aux séquences SEQ ID NO :1-21.

10 19°) Sondes de détection susceptibles d'être mises en oeuvre dans un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 16, caractérisées en ce qu'elles sont sélectionnées dans le groupe constitué par les sondes oligonucléotidiques de séquences SEQ ID NO:22-37.

15 20°) Utilisation des amorces d'amplification et des sondes de détection selon les revendications 18 et 19 pour l'évaluation quantitative du répertoire immunitaire d'un individu.

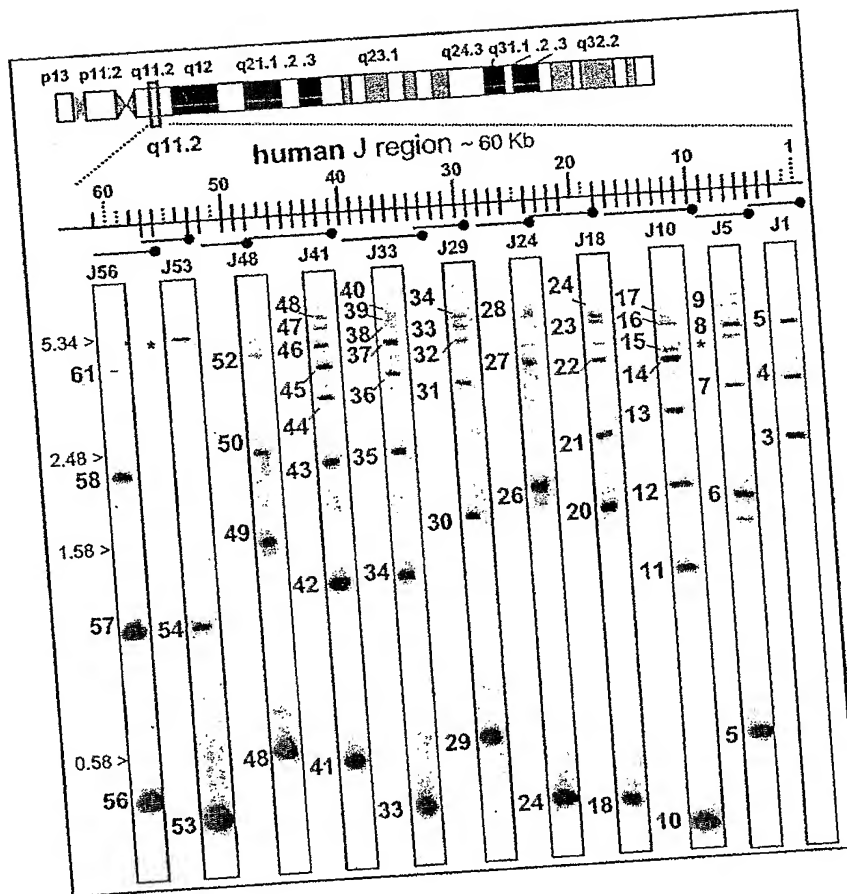


FIGURE 1

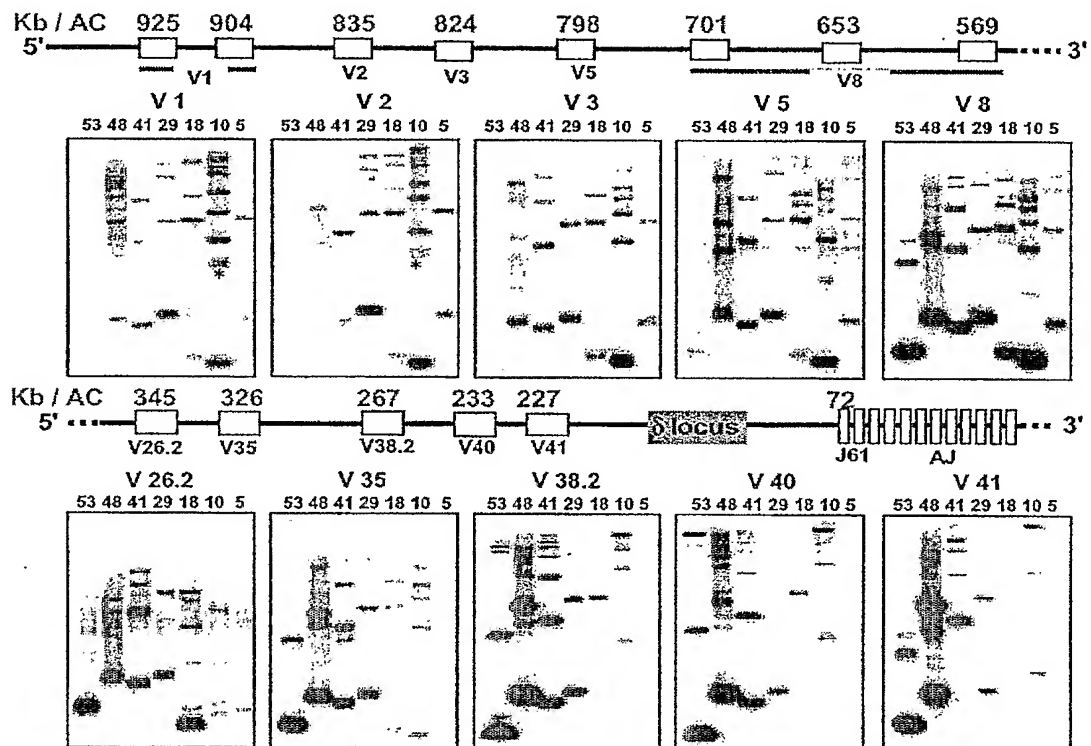


FIGURE 2

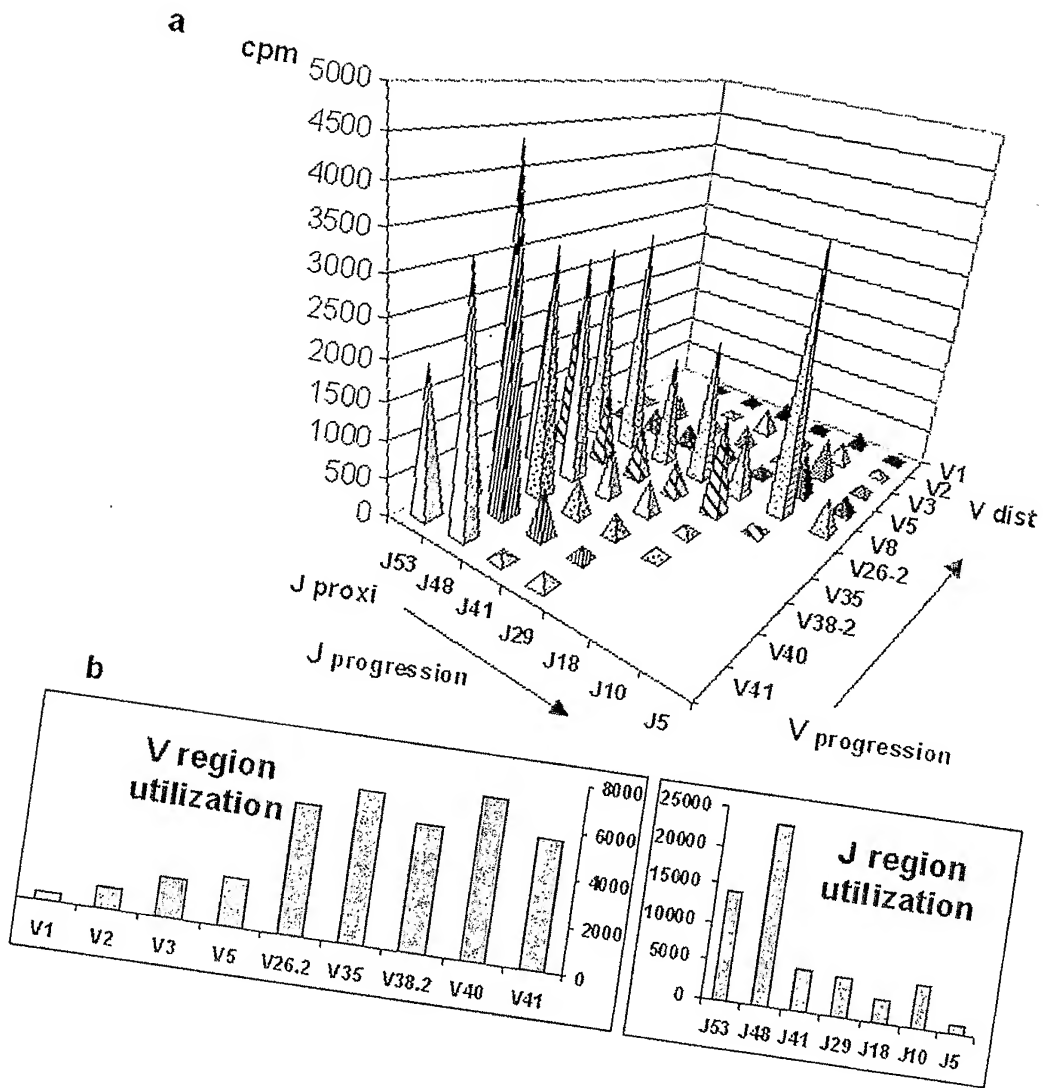


FIGURE 3

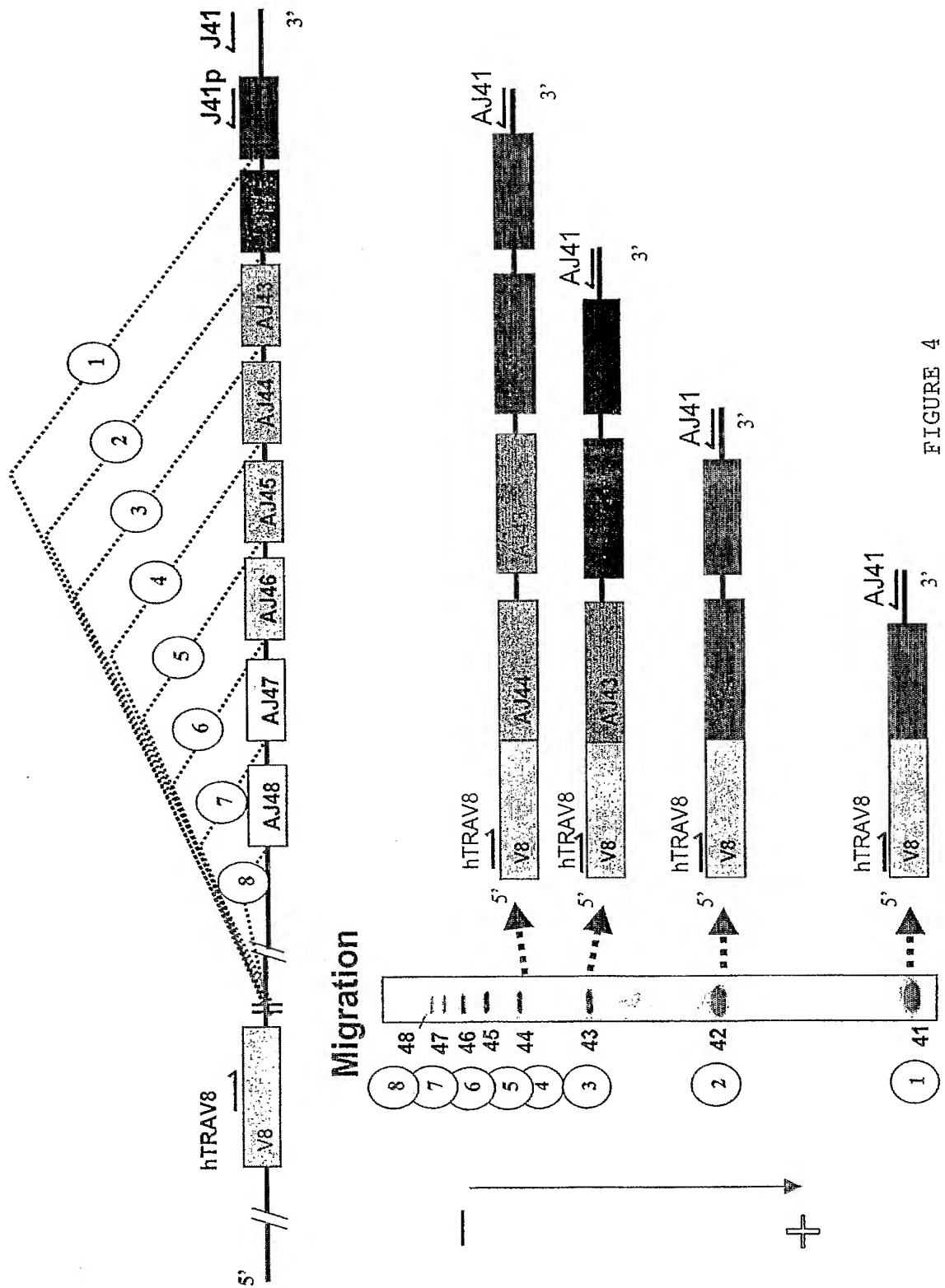


FIGURE 4

hV gene	Heptamer	%	Spacer	%	Nonamer	%	RSS Score	Dist/Co (Kb)	Signal Qty	J topism
hV1-1	CACAGTC	100	ACTATGAGGCCCTCTTAACTGTG	56	CCAAATTC	56	72	925	1604	J10
hV1-2	CACGCTG	86	ACTATGAGGCCCTCTTAACTGTCA	63	CCAAATTC	56	69	904		J10
hV2	CACAGAG	86	GCAGGGAACCCATGAAGAGCTCA	56	ACAGAAAC	78	75	835	1637	J10
hV3	CACAGTC	86	ATAGGCGCTCCAGCGGAGCCACA	56	ACACAAAC	89	80	824	1940	J10
hV5	CACATTC	86	CTTCTCAGGCACTGTATCCTGT	94	ACCGAAAC	100	93	798	2406	J10
hV8-2	CACAGTC	100	CTTGAGACTCCAGGAGAGCTGAA	50	CACAGCCT	33	63	701		
hV8-4	CACAGTC	100	CTTGAGACTCCAGGAGAGCTGAA	50	CATAAACCT	33	63	653	15830	All J area
hV8-6	CACAGTC	100	CCTGAGACTCCAGGAGAGCTGAA	44	CACAAACCT	44	65	569		
hV26-2	CACAGTC	100	GGACAGATGGGCTCCAGCTGTG	56	CAATATCTC	33	64	345	5638	J48
hV35	CACAGTC	100	CTCCCGAAGACCTGCAGCCTGT	94	ACTCAAAC	78	90	326	6520	J48
hV38-2	CACAGTC	100	AGACRAGCARCAGCGAGCGCTT	31	ACGCAACC	89	78	267	11008	J48
hV40	CACGCTG	86	TAAAGCAGAGTGGAGCTATA	44	CAAAACCT	44	60	233	6930	J48
hV41	CACAGTC	100	CTCCCGAGCGACCTGCAGCCCT	94	ACCTAAAC	78	90	227	5630	J48
Consensus	CACAGTC		-A---CAG-CA-CTG-AGCCTGT		ACACAAAC		%			

FIGURE 5

0263-103-SEQ.ST25

SEQUENCE LISTING

<110> COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE

<120> PROCEDE D'EVALUATION QUANTITATIVE D'UN REARRANGEMENT OU D'UNE
RECOMBINAISON GENETIQUE CIBLEE D'UN INDIVIDU ET SES APPLICATIONS

<130> BLO/clg-F0263/103

<160> 45

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> amorce PCR

<400> 1
ggtcgttttt cttcattcct tagtcg 26

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> amorce PCR

<400> 2
tctcttcacg gctgctcacg ctcc 24

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> amorce PCR

<400> 3
tccccttccc attttccact cg 22

<210> 4

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial sequence



0263-103-SEQ.ST25

<220>

<223> amorce PCR

<400> 4

gcacttacac agacagctcc tccacc

26

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> amorce PCR

<400> 5

caggaggaac cagagcccag tc

22

<210> 6

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> amorce PCR

<400> 6

tggagtaggg cagggaggac agt

23

<210> 7

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> amorce PCR

<400> 7

ggctgggaag tttggtgata tagtgtc

27

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> amorce PCR

0263-103-SEQ.ST25

<400> 8
agcagccaaa tccttcagtc tcaa 24

<210> 9
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220>
<223> amorce PCR

<400> 9
aagacaaaaa ctccccatt gtgaaata 28

<210> 10
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220>
<223> amorce PCR

<400> 10
gccctcctga aaatgtgtaa agaaatgt 28

<210> 11
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220>
<223> amorce PCR

<400> 11
cttccccac tcccttcaaa cttac 25

<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220>
<223> amorce PCR

<400> 12
agcacttgac ggcagcagca 20



0263-103-SEQ.ST25

<210> 13
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220>
<223> amorce PCR
<400> 13
tgccccgaga cctgataacc aa 22

<210> 14
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220>
<223> amorce PCR
<400> 14
tcagaacaag ctggaggcaa ctagg 25

<210> 15
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220>
<223> amorce PCR
<400> 15
ggaatagaaa gcgactcact caccagg 27

<210> 16
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220>
<223> amorce PCR
<400> 16
ccacttttag ctgagtgccct gtccc 25

<210> 17
<211> 25

0263-103-SEQ.ST25

<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220>
<223> amorce PCR
<400> 17
ctgtctctgc aatgatgaaa tggcc 25

<210> 18
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220>
<223> amorce PCR
<400> 18
ggaaactctg ggcattgggca g 21

<210> 19
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220>
<223> amorce PCR
<400> 19
actgggcagg agattcgggtt at 22

<210> 20
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220>
<223> amorce PCR
<400> 20
cgccccagat taactgatag ttgct 25

<210> 21
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial sequence



0263-103-SEQ.ST25

<220>
<223> amorce PCR
<400> 21
ataactaaggg caggtgaggc tcca 24

<210> 22
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220>
<223> sonde
<400> 22
tcgtttttct tcatttcctta gtcg 24

<210> 23
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220>
<223> sonde
<400> 23
atgaaacaag accaaagact cactg 25

<210> 24
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220>
<223> sonde
<400> 24
tgaccagct tgacagcca 19

<210> 25
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220>
<223> sonde

0263-103-SEQ.ST25

<400> 25
ggcaatcgct gaagacagaa ag 22

<210> 26
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220>
<223> sonde

<400> 26
gagaacaggt gtaagtgccg cc 22

<210> 27
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220>
<223> sonde

<400> 27
ttggattcac ggttaagaga gttc 24

<210> 28
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220>
<223> sonde

<400> 28
tccagtcca aaggtaatt tctc 24

<210> 29
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220>
<223> sonde

<400> 29
ccgaagttga gtgcataccc g 21



0263-103-SEQ.ST25

<210> 30
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220>
<223> sonde
<400> 30
caaatcaag gatggctaga aacac 25

<210> 31
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220>
<223> sonde
<400> 31
cttccaaagt atagcctccc cag 23

<210> 32
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220>
<223> sonde
<400> 32
ggtgagtttg tttcctcctc cc 22

<210> 33
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220>
<223> sonde
<400> 33
cccaaaagta agtgctctcc tgcc 24

<210> 34
<211> 22

0263-103-SEQ.ST25

<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220>
<223> sonde
<400> 34
cggggagaag tggaaactct gg 22

<210> 35
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220>
<223> sonde
<400> 35
tcagagttat tccttttcca aatg 24

<210> 36
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220>
<223> sonde
<400> 36
cgccccagat taactgatag ttgct 25

<210> 37
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220>
<223> sonde
<400> 37
gggccctgct ccaaactgc 19

<210> 38
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial sequence



0263-103-SEQ.ST25

<220>

<223> séquence amplifiée par PCR

<400> 38

cttgagagat gctgctgtgt actactgcat cctgagagac gggggggggg 50

<210> 39

<211> 65

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> séquence amplifiée par PCR

<400> 39

ccttttgagg agctccagat gaaagactct gcctcttacc tctgtgctgt gaggaatggg 60

ggggg 65

<210> 40

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> séquence amplifiée par PCR

<400> 40

gcgatgtatt tctgtgctta catgagcccg gggggggggg g 41

<210> 41

<211> 328

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> séquence amplifiée par PCR

<400> 41

tattctgtat ctgatgatgt ctttgagaac aggtgtaagt gccgcaaaa atgaagtgga 60

gcagagtcct cagaacctga ctgcccagga aggagaattt atcacaatca actgcagtta 120

ctcggttagga ataagtgcct tacactggct gcaacagcat ccaggaggag gcattgtttc 180

cttgtttatg ctgagctcag ggaagaagaa gcatggaaga ttaattgcca caataaacat 240

acaggaaaag cacagctccc tgcacatcac agcctcccat cccagagact ctgccgtcta 300

catctgtgct gtcagagggg gggggggg 328

0263-103-SEQ.ST25

<210> 42
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> séquence amplifiée par PCR
 <400> 42
 actcagccgt gtactactgt cttctgggag atgggggggg gggg 44

<210> 43
 <211> 162
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> séquence amplifiée par PCR
 <400> 43
 acctggagca ggtctccagc ttgctgacgt atattttttc aaatatggac atgaaacaag 60
 accaaagact cactgttcta ttgaataaaa aggataacat ctgtctctgc gcattgcaga 120
 caccagact ggggactcag ctatctactt ctgtgcagag ag 162

<210> 44
 <211> 215
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> séquence amplifiée par PCR
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(22)
 <223> N= A,T,G ou C

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (80)..(82)
 <223> N= A,T,G ou C



0263-103-SEQ.ST25

<220>

<221> misc_feature

<222> (89)..(90)

<223> N= A,T,G ou C

<220>

<221> misc_feature

<222> (146)..(146)

<223> N= A,T,G ou C

<220>

<221> misc_feature

<222> (156)..(156)

<223> N= A,T,G ou C

<220>

<221> misc_feature

<222> (160)..(160)

<223> N= A,T,G ou C

<220>

<221> misc_feature

<222> (179)..(179)

<223> N= A,T,G ou C

<220>

<221> misc_feature

<222> (186)..(186)

<223> N= A,T,G ou C

<400> 44

actactcatc gtctgttttca cngtatctct tctggtatgt gcaatacccc aaccaaggac	60
tccagcttct cctgaagtan nnatcaggnn ccaccctggg taaaggcatc aacgggttttg	120
aggctgaatt taacaagagt gaaacntcct tccachtgan gaaaccctca gcccatatna	180
gcgacncggc tgagtacttc tgtgctgtga gtgat	215

0263-103-SEQ.ST25

<210> 45

<211> 163

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

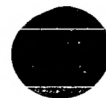
<223> séquence amplifiée par PCR

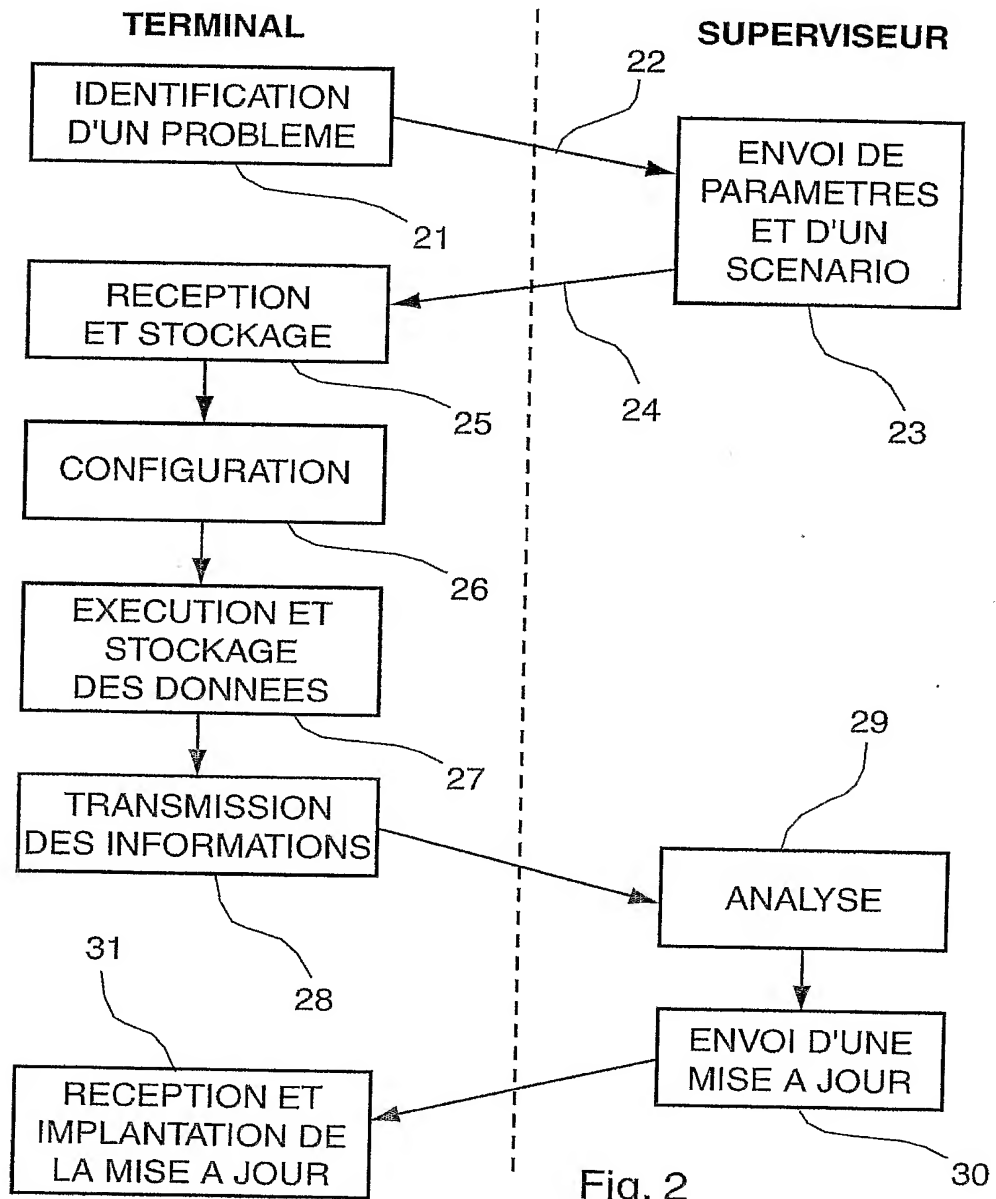
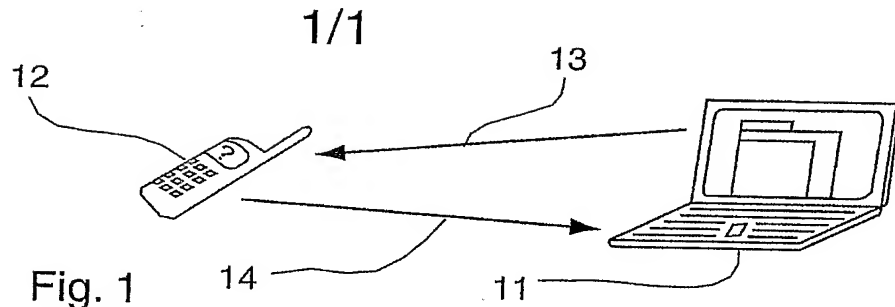
<400> 45

acctggagca ggtctccagt tgctgacgta ttttttttca aatatggaca tgaaacaaga 60

ccaaagactc actgttctat tgaataaaaa ggataaacat ctgtctctgc gcattgcaga 120

caccagact ggggactcag ctatctactt ctgtgcagag agt 163





**BREVET D'INVENTION****CERTIFICAT D'UTILITÉ**

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

**DÉPARTEMENT DES BREVETS**26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1../1..

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 @ W / 270501

Vos références pour ce dossier (facultatif)		9156
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0812838
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)		
Procédé d'analyse du fonctionnement d'un terminal de radiocommunication, terminal de radiocommunication et dispositif d'analyse correspondants		
LE(S) DEMANDEUR(S) :		
WAVECOM 12 Boulevard Garibaldi 92442 ISSY LES MOULINEAUX CEDEX FRANCE		
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :		
1	Nom	MONTES
	Prénoms	Jacques
Adresse	Rue	36 île de Beauté
	Code postal et ville	91413 NOGENT SUR MARNE
Société d'appartenance (facultatif)		
2	Nom	
	Prénoms	
Adresse	Rue	
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		
3	Nom	
	Prénoms	
Adresse	Rue	
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		
Le 31 octobre 2003 P. VIDON (Mandataire CPI n° 92 1250)		

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.



PCT/FR2004/003115

